

**Einfluß von Clofibrat auf Glykogen, Glykolyse und
Adeninnucleotide in der Muskulatur von Ratten**

Florian Wolpert

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554611_0057

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München

Komm. Direktor: Prof. Dr. med. H.J. Karl

Einfluß von Clofibrat auf Glykogen, Glykolyse und Adenin-
nucleotide in der Muskulatur von Ratten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Florian Wolpert

aus

Garmisch-Partenkirchen

1978

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in der
Zeitschrift BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY (Vol. 27, 244, 1978)

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität

München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Schwandt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H.J. Karl

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 3. 10. 1978



Herrn Prof. Dr. med. Peter Schwandt, Oberarzt der II. Medizinischen Klinik der Universität München (Klinikum Großhadern), möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, sowie für sein mir stets entgegengebrachtes Wohlwollen danken.

Herrn Dr. med. Jörn Wilkening, dortigen wiss. Assistent, gilt mein besonderer Dank für seine zahlreichen Ratschläge und seine stete Hilfsbereitschaft in praktischen und theoretischen Fragen, ohne welche eine adäquate Bearbeitung des Themas nicht möglich gewesen wäre.

Frau Annemarie Wiedenbach, technische Assistentin im Labor von Prof. Dr. med. Peter Schwandt, sei gedankt für ihre Assistenz und ihre freundliche Art, durch welche die Laborarbeit angenehm aufgelockert wurde.

Meinen Eltern

Inhaltsangabe

A.	Einleitung	S. 1
	Fragestellung	
B.	Theoretische Grundlagen	S. 5
I.	Abbau von Glukose zu Pyruvat/Lactat	S. 5
II.	Darstellung der enzymatischen Kontrollpunkte der Glykolyse	S. 6
C.	Methodik	S. 11
I.	Zusammensetzung der Clofibrat- bzw. Kontroll- diät auf die Gewichtszunahme der Ratten	S. 11
II.	Anästhesie und Herstellung des Muskelhomoge- nats	S. 11
III.	Aktivitätsbestimmung der Enzyme	S. 15
1.	Messung der Hexokinase	S. 15
a.	Puffer	
b.	Testansatz	
2.	Messung der Aktivität der PFK	S. 16
a.	Puffer	
b.	Testansatz	
3.	Messung der Aktivität der PK	S. 17
a.	Puffer	
b.	Testansatz	
IV.	Messung der Substratkonzentrationen im Muskel ...	S. 18
1.	Glykogenbestimmung	S. 18
a.	Aufspaltung in Glykosyleinheiten	
b.	Bestimmung der Glykosyleinheiten	
2.	Messung der D-Glukose	S. 20
3.	Messung von Glukose-6-Phosphat und Fructose- 6-Phosphat	S. 20
4.	Messung von Fructose-1-6-Diphosphat	S. 20
a.	Stammpuffer	
b.	Testansatz	

5.	Messung von Pyruvat und Phosphoenolpyruvat	S. 21
a.	Stammpuffer	
b.	Testansatz	
6.	Messung von Lactat	S. 22
a.	Testpuffer	
b.	Testansatz	
7.	Messung von Adenosintriphosphat (ATP) und Kreatinphosphat (Cr-P)	S. 22
8.	Messung von Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP)	S. 23
V.	Messung von Glykogen, Glukose-6-Phosphat, ATP, ADP, AMP u. Cr-P in der Herzmuskulatur	S. 23
VI.	Intraperitoneale Glukosebelastung mit fol- gender Bestimmung von Glykogen in der Herz- und Skelettmuskulatur	S. 24
VII.	Materialien	S. 26
VIII.	Statistische Auswertung	S. 26
D.	E r g e b n i s s e	S. 29
I.	Ergebnisse der Messung der Aktivitäten der HK, PFK und PK nach 3 Wochen Clofibrat	S. 29
II.	Konzentrationen der Metabolite der Glykolyse in der Skelettmuskulatur nach 3 Wochen Clo- fibrat	S. 29
III.	Gehalt des Skelettmuskels an Adenosinphos- phaten und Kreatinphosphat nach 3 Wochen Clofibrat	S. 31
IV.	Konzentrationen der Metabolite der Glykolyse im Skelettmuskel nach 6 Wochen Clofibrat	S. 31
V.	Gehalt der Skelettmuskulatur an Adenosin- phosphaten und Kreatinphosphat nach 6 Wochen Clofibrat	S. 34
VI.	Auslaßversuch	S. 34
VII.	Gehalt der Herzmuskulatur an Glykogen, Ade- nosinphosphaten und Kreatinphosphat nach 3 Wochen Clofibrat	S. 37

VIII.	Gehalt der Herzmuskulatur an Glykogen, Glukose-6-Phosphat, Adenosinphosphaten und Kreatinphosphat nach 6 Wochen Clofibrat	S. 37
IX.	Intraperitoneale Glukosebelastung mit darauffolgender Glykogenbestimmung in Skelett- und Herzmuskulatur nach 3 Wochen Clofibrat	S. 40
E.	D i s k u s s i o n	S. 44
I.	Clofibrat und dessen Einwirkung auf die Glykolyse	S. 44
1.	Veränderung der Schlüsselenzyme (HK, PFK, PK) der Glykolyse durch Clofibrat	S. 44
a.	Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren ..	S. 44
b.	Deutung der Aktivitätsänderung	S. 44
c.	Bedeutung der Aktivitätsänderung der Schlüsselenzyme für den flux der Glykolyse	S. 45
2.	Veränderungen der Metabolite der Glykolyse durch Clofibrat	S. 46
a.	Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren ..	S. 46
b.	Bedeutung der Veränderungen der Metabolite für den flux der Glykolyse	S. 46
3.	Veränderungen der Modifikatoren der Glykolyse (Adennucleotide, Kreatin-Phosphat, Energy-Charge) durch Clofibrat und die Bedeutung deren Veränderungen für den flux der Glykolyse .	S. 46
4.	Zusammenfassende Betrachtung der unter 1, 2 und 3 angeführten Veränderungen für den flux der Glykolyse	S. 51
II.	Clofibrat und dessen Wirkung auf den Glykogengehalt	S. 51
1.	Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren ..	S. 51
2.	Deutung des Glykogenabfalls	S. 52
a.	Diskussion einer verstärkten Glykogenolyse als Ursache für den Glykogenabfall durch Clofibrat	S. 52

b.	Diskussion einer verminderten Glykogensynthese als Ursache für den Glykogenabfall durch Clofibrat	S. 53
3.	Auswirkung einer i.p. Glukosebelastung auf den durch Clofibrat induzierten Glykogenabfall	S. 54
III.	Clofibrat und dessen Wirkung auf den ATP-gehalt	S. 56
1.	Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren	S. 56
2.	Deutung des durch Clofibrat bedingten Konzentrationsabfall von ATP	S. 56
F.	Z u s a m m e n f a s s u n g	S. 59
G.	L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	S. 60

Abkürzungen von Enzymen, Substraten und Cofaktoren

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adosintripphosphat
Cr-P	Kreatinphosphat
EDTA	Aethylendiamintetraessigsäure
F-6-P	Fructose-6-Phosphat
F-1-6-BP	Fructose-1-6-Diphosphat
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
G-6-PDH	Glukose-6-Phosphatdehydrogenase
Glyc-3-PDH	Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase
HK	Hexokinase
Lac	Lactat
LDH	Lactatdehydrogenase
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	reduziertes NAD
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
P _i	anorganisches Phosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFK	Phosphofructukinase
PK	Pyruvatkinase
Pyr	Pyruvat
TIM	Trioseisomerase
TRA	Triäthanolamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan

A. Einleitung u. Zusammenfassung

Clofibrat (CPIB, Atromid S) (Aethyl-p-chlorophenoxyisobutyrat) ist ein häufig angewandtes Hypolipidemicum. Thorp und Waring waren die ersten, die über diese hypolipidemischen Eigenschaften berichteten (⁸⁶Thorp u. Waring, 1962). Seither sind zahlreiche Veröffentlichungen erschienen, in denen der Einfluß von Clofibrat auf den Fettstoffwechsel sowohl in vitro, als auch in vivo beschrieben wird: Angriffspunkte der hypolipidemischen Wirkung von Clofibrat sind die Synthese, der Transport und die periphere Utilisation von Fett (⁶Avoy, 1965; ²Adams, 1971; ⁷⁸Segal, 1969; ¹⁸Cenedella, 1968; ⁷Barett, 1968; ¹⁰¹Wilson, 1972; ⁹⁷Westerfeld, 1972; ⁵⁶Nestel, 1968; ⁸⁹Tolman, 1970; ³⁸Green, 1970; ³⁷Giocoli, 1971). Obwohl ein enger Zusammenhang zwischen Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel besteht, wurde bis jetzt in der Literatur der Einfluß von CPIB auf den Kohlenhydratstoffwechsel nur wenig berücksichtigt (siehe Tabelle 1): CPIB vermindert den Glykogengehalt in der Leber von Ratten (⁶⁹Platt, 1966; ¹⁰³Zakim, 1970) und Hunden (³³Gans, 1971) sowie den Glykogengehalt der Muskulatur von Ratten (⁵²Miyazawa, 1975; ⁶⁶Paul, 1977), vermindert die L-Glycero-3-Phosphat Konzentration in der Leber von Ratten (⁶⁷Pereira, 1970). Eine erhöhte Oxidation von C¹⁴-markierter Glukose wurde aufgezeigt in Leberschnitten (³³Gans, 1971) und im Fettgewebe von Ratten (⁹⁶Weis, 1973). CPIB modifiziert den Gehalt von Metaboliten der Glykolyse in der Rattenleber (⁹⁹Wilkening und Schwandt, 1977), reduziert die Aktivität der FDP-Aldolase in der Rattenleber (¹⁰³Zakim, 1969). Nicht nur im Tierexperiment, sondern auch beim Menschen sind Wirkungen von CPIB auf den Kohlenhydratstoffwechsel beschrieben: CPIB verbessert die pathologische Glukosetoleranz (¹³Bruns, 1970; ²⁷Eaton und Nye, 1973; ²⁹Fenderson, 1974; ³⁰Ferrari, 1976; ⁷⁷Schwandt,

Tab 1: Einfluß von Clofibrat auf den Kohlenhydratstoffwechsel in Leber, Muskel und Fettgewebe.

a = Ratte, b = Hund, c = Mensch

↑ = erhöht, ↓ = reduziert, = = unverändert

leeres Feld = bisher keine Daten vorhanden

a₁ = ⁷⁰Platt, 1966; a₂ = ⁹⁹Wilkening u. Schwandt, 1977;

a₃ = ¹⁰³Zakim, 1970; a₄ = ⁵²Miyazawa, 1975; a₅ = ⁶⁶Paul, 1977; b₁ = ³³Gans, 1971; c₁ = ⁴⁹Lufkin, 1974;

	Fettgewebe	Leber	Muskel
1. Glukose-Metaboliten			
a. Glykogen		↓ a ₁ , a ₂ , a ₃ , b ₁	↓ a ₄ , a ₅
b. G-6-P		↓ a ₂ , a ₄	
c. F-6-P		↓ a ₂ , a ₄	
d. F-1-6-DP		↑ a ₂ , ↓ a ₄	
e. 3-PG		↑ a ₂ , a ₄	
f. PEP		↑ a ₂ , a ₄	
g. Pyr		↑ a ₂ , a ₄	
h. Lac		↑ a ₂ , a ₄	
2. Schlüsselenzyme d. Glykolyse			
a. HK		= a ₂ , a ₃	
b. PFK	↓ c ₁	↓ a ₂	
c. PK	↓ c ₁	↓ a ₂	

1976) und reduziert die Aktivitäten der FDF-Aldolase, der PFK und PK im Fettgewebe (⁴⁹Lufkin, 1974). Bei der Behandlung von hyperlipidemischen Patienten mit Clofibrat wurde berichtet, daß sich unter der Clofibrat-Therapie bei einigen Patienten ein akutes muskuläres Syndrom einstellte, das begleitet war von Muskelschmerzen, Krämpfen, Schwäche und Steifheit (⁴²Katsilambros, 1972; ⁴⁶Langer, 1968; ⁷⁹Sekowski, 1972); auch bei Ratten ließ sich das Bild einer Muskelschwäche unter therapeutisch angewandten Dosen induzieren (²⁵Dromgoole, 1975; ²⁸Eberstein, 1974). Dies scheint ein ungewöhnlicher Nebeneffekt der CFI-B-Therapie zu sein (⁸²Smith, 1970; ⁹¹Vester, 1969), womöglich auch bedingt durch eine Akkumulation des Medikaments infolge von chronischer Nierenkrankheit (³¹Gabriel, 1976; ⁶⁸Pierides, 1975; ⁷⁵Rumpf, 1976) oder durch eine Erhöhung von freien, nicht an Albumin gebundenes CFI-B infolge eines nephrotischen Syndroms mit dazugehöriger Hypalbuminaemie (¹¹Bridgman, 1972; ²⁴Denizot, 1973). Diese muskulären Symptome werden durch leichte Anstrengung verstärkt (³⁵Geltner, 1975). Ähnliche Symptome beobachtete man bei Patienten, welche an einem angeborenen Mangel der Muskel-Phosphorylase leiden, was dazu führt, daß dem Muskel ein ungenügendes Glukoseangebot aus den Glykogenreserven und damit ein ungenügendes Angebot an energiereichen Phosphaten während der Muskelarbeit zur Verfügung steht (⁴Mc Ardle, 1951); denn neben den FFA stellt der Abbau von Glykogen und Glukose über den Citronensäurezyklus, bzw. bei O₂-Mangel die anaerobe Glykolyse, die wichtigste Energiequelle für den primären Energielieferanten der Kontraktion, das ATP, dar (⁸⁰Siegenthaler, 1973). Diese Ähnlichkeit zwischen dem durch Clofibrat und dem durch den hereditären Enzymdefekt verursachten Krankheitsbild, zusammen mit dem oben erwähnten Glykogenverlust durch Clofibrat, läßt eine Interferenz dieses Medikaments mit dem Glukosestoffwechsel der Muskulatur vermuten. In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine mögliche Inter-

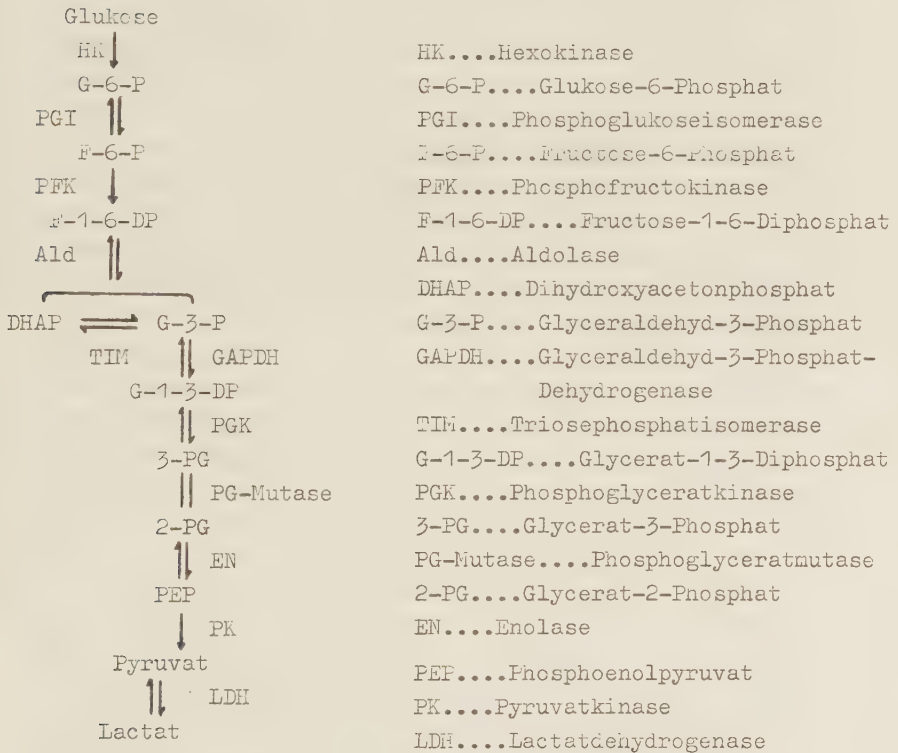
aktion von CFIB mit dem Glykogengehalt und der Glykolyse des Muskels untersucht. Es wurden die einzelnen Metabolitkonzentrationen und die Aktivitäten der Schlüsselenzyme der Glykolyse gemessen. Weiterhin wurden die Konzentrationen von Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Adenosinmonophosphat (AMP) und Kreatinphosphat (Cr-P) bestimmt, weil diese eine große Rolle in der Modifikation der Glykolyse spielen und weil umgekehrt eine veränderte Glykolyse eine Interferenz mit den energiereichen Phosphaten erwarten läßt.

Nachdem sich in den ersten Versuchen mit der quergestreiften Muskulatur eine auffallende Beeinflussung des Glykogengehalts zeigte, wollten wir sehen, ob Clofibrat auch im Herzmuskel mit der Glykogenkonzentration interferiert; weiterhin bestimmten wir die Konzentrationen von ATP, ADP, AMP und Cr-P.

Nachdem wir beobachteten, daß Clofibrat die Glykogenspeicher sowohl von Skelett- als auch Herzmuskulatur teilweise entleerte, interessierte uns, ob eine Glukosebelastung die Glykogenspeicher wieder auffüllen würde.

1. Theoretische Grundlagen: kurze Skizzierung der Glykolyse und Darstellung der enzymatischen Kontrollpunkte der Glykolyse

I. Der Abbau von Glukose zu Pyruvat/Lactat ist im folgenden Schema skizziert:



II. Darstellung der enzymatischen Kontrollpunkte der Glycolyse

Der stoffwechselweg der Glykolyse (wie auch die anderen Stoffwechselwege) besteht aus einer ganzen Anzahl von Reaktionen, wobei die Mehrzahl "close to equilibrium" und nur die Minderheit "non equilibrium" sind. Als "equilibrium" werden Reaktionen bezeichnet, wenn die Konzentrationen (oder korrekter ausgedrückt, die thermodynamischen Aktivitäten) der Substrate und der aus dieser Reaktion folgenden Produkte derart sind, daß weder Energie als Wärme verloren (oder dazugewonnen) wird, noch daß Arbeit während der oder durch die Reaktion geleistet wird; je größer jedoch der Verlust an Wärme, desto größer wird auch die Entfernung einer Reaktion vom "equilibrium" sein; diejenigen Reaktionen, welche weit vom "equilibrium" entfernt sind, werden irreversible oder "non-equilibrium" Reaktionen genannt (⁵⁷Newsholme, 1974). Während bei der "equilibrium" Reaktion also keine Energie verloren geht, kann bei der "non-equilibrium" Reaktion nur ein Teil der in der chemischen Bindung begründeten Energie für die Zelle (z.B. in Form energiereicher Phosphate) gespeichert werden. Zur Erläuterung eine Kurz-Version der Glykolyse:



Falls dieser Stoffwechselweg im Gleichgewicht wäre, würde die gesamte Energie, welche bei der Umwandlung von Glukose zu Lactat frei wird, in Form von ATP konserviert werden und der Prozeß der Energieübertragung wäre zu 100% effizient; es wäre dann aber auch kein Netto-flux und somit auch keine Nettosynthese von ATP möglich. Somit ist es also notwendig, daß in einem Stoffwechselweg neben "equilibrium" Reaktionen auch "non-equilibrium" Reaktionen

verkommen (ausdrücklich sei betont, daß eine Reaktion nicht "equilibrium" sein kann, falls durch diese Reaktion ein Netto-flux gegeben ist; sie kann jedoch fast "equilibrium" sein). Der Verlust an Wärme ist der Preis, den der Organismus zahlen muß, um Unidirektionalität eines Stoffwechselweges zu bewirken. Für die Regulation des Stoffwechsels sind gerade die "non-equilibrium" Reaktionen von Bedeutung, sie stellen die Kontrollpunkte des Stoffwechselweges dar; die Enzyme, die diese Reaktionen katalysieren, nennt man Schlüsselenzyme. Bücher hat diese "non-equilibrium" Reaktionen mit einem Wasserwehr verglichen: genauso wie Wasserwehre entlang eines Flusses durch die Höhe des Wehres die Durchflußrate des Wassers regulieren, so regulieren Enzyme von "non-equilibrium" Reaktionen durch die Höhe ihrer Aktivität den flux eines Stoffwechselweges (¹⁵Bücher, 1964).

Um "non-equilibrium" Reaktionen als solche zu klassifizieren, ist es nötig, die equilibrium Konstante K (oder auch die experimentell besser zugängliche "apparent equilibrium" Konstante K') mit der mass-action-ratio T zu vergleichen (und die maximale Aktivität des fraglichen Enzymes zu messen). (Die mass-action-ratio ist - im Gegensatz zur in vitro gemessenen K' - das Produkt/Substrat Verhältnis in vivo). Falls der Quotient T/K' mindestens 20 ist, so handelt es sich wahrscheinlich um eine "non-equilibrium" Reaktion (⁷³Rolleston, 1972). Die Messung der maximalen Aktivität von Enzymen stellt eine weitere Methode dar, "non-equilibrium" Reaktionen zu ermitteln, aus folgendem Grund: eine "non-equilibrium" Reaktion kommt deshalb in einem Stoffwechselweg vor, weil das Enzym, welches diese Reaktion katalysiert, nicht genügend aktiv ist, um Produkte und Substrate ins Gleichgewicht zu bringen. Die vorhergehenden und nachfolgenden Enzyme dagegen besitzen eine weitaus größere katalytische Kapazität für die Formation von Substraten bzw. für die Entfernung von Produkten als

das Enzym der "non-equilibrium" Reaktion für die Interkonversion von Produkten und Substraten. Gewöhnlich ist die Aktivität von Enzymen der fast "equilibrium" Reaktionen um 10 bis 1000 mal größer als diejenige der Enzyme von "non-equilibrium" Reaktionen. Bei der Interpretation von Enzymaktivitäten sollte man sich vor Augen halten, daß ein Enzym, welches eine hohe Aktivität in vitro besitzt, nicht notwendigerweise auch eine "equilibrium" Reaktion katalysiert. Es könnte nämlich auch sein, daß das Enzym in vivo in hohem Maße gehemmt ist. Die Daten der Aktivitätsmessung sollten mit denen der mass-action-ratio übereinstimmen. Im Zweifelsfall hat die mass-action-ratio eine größere Aussagekraft, da durch sie die Verhältnisse in vivo aufgezeigt werden (⁵⁷Newsholme, 1974)

Mass-action-ratio und "equilibrium" Konstanten von HK, PFK und PK

Der Vergleich der mass-action-ratio mit der apparent-equilibrium Konstante K' (siehe Tabelle 2) sowohl von der HK, als auch von der PFK, sowie von der PK übertrifft bei weitem die von Rolleston (⁷³Rolleston, 1972) aufgestellte Forderung, daß der Quotient $K'/\text{mass-action-ratio}$ größer als 20 sein muß, um eine Reaktion als non-equilibrium Reaktion zu klassifizieren.

Maximale Aktivitäten der HK, PFK und PK

Die maximalen Aktivitäten der Hexokinase (HK), Phosphofructokinase (PFK) und Pyruvatkinase (PK) sind in Tabelle 2 aufgeführt. HK und PFK zeigen eine niedrigere Aktivität gegenüber PK. Wenn die Aktivitäten in Verbindung mit der mass-action-ratio gesehen werden, kann eindeutig nur HK und PFK als non-equilibrium-Enzym klassifiziert werden. Ein Problem stellt die PK dar: die mass-action-ratio zeigt an, daß die PK eine non-equilibrium Reaktion katalysiert, die maximale Aktivität aber läßt das Gegen-

Tabelle 2:

Maximale Enzymaktivitäten der HK, PFK und PK, und Vergleich von deren mass-action-ratio (T) mit ihren apparent-equilibrium Konstanten (K').

Die Enzymaktivitäten sind in U/g Frischgewicht angegeben; T und K' sind dimensionslos.

(Die Aktivitäten wurden von ⁵⁷Newsholme, 1974, übernommen; mass-action-ratio (T) und apparent-equilibrium Konstante (K') von ¹⁰⁰Williamson, 1965).

Enzym	Enzymaktivitäten im Skelettmuskel	Apparent-equilibrium Konstante (K')	Mass-action-ratio (T) im Herzmuskel
Hexokinase (HK)	1,5	$1-5 \times 10^3$	0,08
Phosphofructokinase (PFK)	56	$1,2 \times 10^3$	0,03
Pyruvatkinase (PK)	387	$2-15 \times 10^3$	40

teil vermuten; im Zweifelsfalle (s.o.: ⁵⁷Newsholme, 1974) stellt aber die mass-action-ratio das bessere Kriterium dar ; es wird somit vermutet, daß auch die PK eine non-equilibrium Reaktion katalysiert (⁵⁷Newsholme, 1974); somit sind alle 3 Enzyme HK, PFK und PK regulatorische Enzyme nach der weniger restriktiven Definition von Newsholme (⁵⁷Newsholme, 1974), daß diejenigen Enzyme regulatorisch sind, "welche eine non-equilibrium Reaktion katalysieren".

C. Methodik

I. Zusammensetzung der Clofibrat- bzw. Kontrolldiät und

Einfluß der Diät auf die Gewichtszunahme der Ratten

Versuchstiere waren weibliche Ratten (Wistar), ad libitum gefüttert. Das Futter (das von der ICI Industrial Company, Macclesfield, England, zur Verfügung gestellt wurde) enthielt 18,45% Protein, 2,15% Fett und 52,9% Kohlenhydrate. Das Futter der Experimentalgruppe enthielt zusätzlich 0,25% Clofibrat.

Um einen eventuellen Einfluß der CPIB enthaltenden Diät auf die Futtereinnahme und Gewichtszunahme auszuschließen, wurden bei den Ratten, die 3 Wochen, und bei denjenigen, die 6 Wochen auf Diät- bzw. Kontrollfutter gesetzt wurden, Ausgangsgewicht, Futtermenge und Endgewicht gemessen. Dabei zeigten diese Parameter (s. Tab. 3) annähernd gleiche Werte, wie schon andere Untersucher feststellten (⁶Avoy, 1965, ⁹Best, 1964, ⁸⁶Thorp, 1962, ⁹⁸White, 1971).

II. Anästhesie und Herstellung des Muskelhomogenats

Bei den Versuchen wurden zur Anästhesie 60 mg/kg Körpergewicht Nembutal^R i.p. injiziert. Dies geschah immer morgens zwischen 9 und 10 Uhr, um unterschiedliche Stoffwechsellagen durch einen circadianen Rhythmus zu vermeiden (³²Ganong, 1972).

Nach Betäubung wurde die Oberschenkelmuskulatur beider Hinterbeine dargestellt. Von der linken Seite wurde ein zwischen 600 und 800 mg schweres, möglichst dünnes Scheibchen Muskulatur (um den nachfolgenden Gefriervorgang zu beschleunigen) abgetrennt, gefriergestoppt und in flüssigen Stickstoff aufbewahrt (¹⁰²Wollenberger, 1960).

Tabelle 3: Effekt von CPIB auf Futteraufnahme und Gewichtszuwachs

Die Werte zeigen dabei den Durchschnitt von jeweils 5 Ratten pro Gruppe $\pm$ S.E.M.

Behandlung	Ausgangsgewicht (g)	Endgewicht (g)	Futteraufnahme (g)	Gewichtszunahme (g)
3 Wochen Kontrolle	161,7 $\pm$ 7,5	236,3 $\pm$ 7,4	168	24,9
3 Wochen Clofibrat	124 $\pm$ 5,5	209 $\pm$ 18,0	168	28,3
6 Wochen Kontrolle	137,0 $\pm$ 5,7	237,0 $\pm$ 25,1	140	16,7
6 Wochen Clofibrat	117,0 $\pm$ 5,7	232,4 $\pm$ 8,0	154	19,2

Zur Messung der Enzymaktivitäten wurde ein Stück Muskulatur vom rechten Oberschenkel abgetrennt und in Form von feinen Streifchen, welche mit einer Schere geschnitten wurden, in durch Glasstopfen verschließbare Glaskolben gebracht. Diese enthielten 5 ml von dem für den jeweiligen Enzymtest notwendigen Homogenisationsmedium (Herstellung der Homogenisationsmedien, s. Tab. 4). Die Glaskolben wurden inclusive der 5 ml Homogenisationsmedium vorher gewogen und in Eis gestellt. In den für PFK und PK zugehörigen Glaskolben wurden zwischen 150 und 200 mg, in den für HK zugehörigen zwischen 600 und 800 mg Muskel eingegeben. Die tatsächliche Einwaage von Muskelgewebe wurde aus der Differenz zwischen dem Gewicht vor und nach Einbringen des Muskelgewebes berechnet. Nun wurde der Inhalt des Glaskolbens (Muskelgewebe + Homogenisationsmedium) in ein Pottergefäß gegeben, wobei darauf geachtet wurde, daß kein Gewebe im Kolben zurück blieb. Das Pottergefäß wurde, um den Homogenisationsvorgang bei 0° C ablaufen zu lassen, von einem weiteren Gefäß umgeben, das eine Eis-Wasser-Mischung enthielt. Nun wurde das Muskelgewebe durch 3 Minuten dauerndes Pottern bei 1500 Umdrehungen pro Minute mittels eines elektrischen Homogenisators (Braun-Melsungen) homogenisiert. Das Homogenisat wurde in Eppendorf-Cups (Inhalt ca. 1,5 ml) verbracht, bei 14000 g 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in weitere Eppendorf-Cups gefüllt, welche zur Kühllhaltung zwischen Eisstückchen aufbewahrt wurden. Nun war das Muskelhomogenat für die folgende Enzymaktivitätsmessung testbereit.

Tabelle 4: Herstellung der Homogenisationsmedien

Homogenisationsmedium für HK (nach ¹⁹Crabtree, 1972)

TRA	0,464 g	wurden in ein Becherglas
EDTA	0,019 g	eingewogen; dazu 50 ml H ₂ O;
MgCl ₂	0,020 g	diese Lösung wurde mit NaOH
Mercapto-		auf pH 7,5 eingestellt
äthanol	105 μ l	

Homogenisationsmedium für PFK (nach ¹²Brock, 1969)

1,742 g K₂HPO₄ wurden in 100 ml H₂O gegeben; diese Lösung wurde mit 0,1 M KH₂PO₄ auf pH 8,00 eingestellt.

Homogenisationsmedium für PK (nach ⁸⁴Tanaka, 1967)

TRA	0,370 g	wurden in 100 ml H ₂ O gege-
Saccharose	8,550 g	ben; diese Lösung wurde mit
MgCl ₂	0,203 g	NaOH auf pH 7,5 eingestellt.

III. Aktivitätsbestimmung der Enzyme

1. Messung der Hexokinase (nach ¹⁹Crabtree, 1972)

a. Puffer

12 mg $MgCl_2$, 2,3 mg EDTA und 2 μ l Mercaptoäthanol wurden in 10 ml 0,1 M Trispuffer gegeben, der mit HCl auf pH 7,5 eingestellt wurde.

b. Testansatz

500 μ l	Puffer
50 μ l	KCl (17,8 mg/ml H_2O)
50 μ l	ATP (33mg/ml H_2O)
20 μ l	NADP (16 mg/ml H_2O)
50 μ l	Glucose (4 mg/ml H_2O)
100 μ l	Kreatinphosphat (29 mg/ml H_2O)
5 μ l	Kreatin-Kinase (2mg/200 μ l $(NH_4)_2SO_4$)
20 μ l	Probe

wurden gemischt, dann wurde E_c abgelesen; Start der Reaktion durch Zugabe von 5 μ l G-6-P-Dehydrogenase; Verlauf der Enzymkinetik wurde bei Papiervorschub 1 cm/min registriert. Gemessen wurde bei der Wellenlänge 334 nm und 25° Celsius.

Die Aktivität pro Gramm Frischgewicht (U/g) berechnete sich aus folgender Formel:

$$U/g = \frac{\Delta E/min \cdot KV (5 + 0,75 \cdot g \text{ Gewebe})}{PV \cdot \epsilon \cdot g \text{ Gewebe}} \cdot f$$

wobei ΔE = Extinktionsabnahme

KV = Küvettenvolumen

PV = Probenvolumen

ϵ = Extinktionskoeffizient (6,1 bei E_{334})

f = Verdünnungsfaktor (in diesem Falle f = 1, da das Homogenat nicht verdünnt wurde)

2. Messung der Aktivität von PFK (nach ¹²Brock, 1969)

a. Puffer

2,2 mg NADH, 24 mg ATP, 3,1 mg Dithioerytrol wurden in 10 ml 0,1 M Tris-Puffer gegeben, welcher mit HCl auf pH 8,0 eingestellt wurde.

b. Testansatz

Das Homogenat wurde vor der Austestung mit Homogenisationsmedium 1:11 verdünnt.

500 μ l	Puffer
100 μ l	MgCl ₂ (20,4 mg/ml H ₂ O)
50 μ l	KCl (112 mg/1,5 ml H ₂ O)
300 μ l	H ₂ O
10 μ l	Enzymgemisch: 10 μ l Aldolase + 5 μ l TIM + 5 μ l Glycerin-3-PDH wurden 4 Minuten zentrifugiert, der Überstand dekantiert, in 200 μ l Testpuffer aufgenommen und resuspendiert

50 μ l Probe

wurden gemischt, dann wurde E₀ abgelesen; Start mit 40 μ l F-6-P (15 mg/ml H₂O); die Enzymkinetik wurde bei 1cm/min Papiervorschub und Wellenlänge 366 nm registriert. Berechnung wie bei HK, nur, daß ϵ = 3,4 (da bei Wellenlänge 366 nm registriert wurde), f = 11 (da Probe mit Homogenisationsmedium 1:11 verdünnt wurde; außerdem wurde das Ergebnis durch 2 dividiert, da es sich bei dieser Reaktion um einen 2-Elektronen-Übergang handelt (1 Hexose wird in 2 Trioseeinheiten aufgespalten)).

3. Messung der Aktivität von PK (nach ⁸⁴Tanaka, 1967)

a. Puffer

aa. Stammpuffer

TRA	3,0 g	wurden zu 100 ml H ₂ O gege-
KCL	0,934 g	ben und mit NaOH auf pH 7,5
MgSO ₄ 7(H ₂ O)	0,534 g	eingestellt
EDTA		

ab. Testpuffer

2,8 mg NADH und 9,3 PEP werden zu 10 ml Stammpuffer gegeben.

b. Testansatz

Das Homogenat wurde vor der Austestung 1:11 mit Homogenisationsmedium verdünnt.

500 μ l	Puffer
100 μ l	Glukose (4mg/ml H ₂ O)
200 μ l	H ₂ O
5 μ l	LDH (1:11 mit (NH ₄) ₂ SO ₄ verdünnt)
5 μ l	HK (1:11 mit (NH ₄) ₂ SO ₄ verdünnt)
20 μ l	Probe

wurden gemischt, dann wurde E₀ gemessen; Start der Reaktion mit 100 μ l ADP (14 mg/ml H₂O); der Verlauf der Enzymkinetik wurde bei Papiervorschub 1 cm/min und Wellenlänge 366 nm registriert.

Berechnung der Aktivität wie bei HK bzw. PFK.

Die Methode von ⁸⁴Tanaka (1967) wurde insofern geändert, als Glucose (0,5 M) und Hexokinase zum Testansatz gegeben wurden, um zu verhindern, daß ATP-Konzentrationen im Testansatz erreicht wurden, welche einen inhibitorischen Effekt auf die Reaktion ausüben können.

IV. Messung der Substratkonzentrationen im Muskel

Nachdem die Registrierung der Enzymaktivitäten beendet war, wurde mit der Substrat-messung begonnen. Dazu wurde das tiefgefrorene Muskelplättchen aus dem flüssigen Stickstoff geholt und sofort in den mit 4 ml HClO_4 gefüllten Homogenisator Kolben gebracht. Nach erfolgter Homogenisierung bei 1500 Umdrehungen/min wurden 200 μl von dem frisch hergestellten Homogenat für die Glykogenbestimmung entnommen (ausführliche Beschreibung später). Das restliche Homogenat wurde 10-15 Minuten aufbewahrt, anschließend in 3 Eppendorf-Cups (Volumen 1,5 ml) gefüllt und 5 Minuten bei 14000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Zentrifugenglas dekantiert und mit festem KHCO_3 neutralisiert. Das auf pH 6,5-7 eingestellte Homogenat wurde 10-15 Minuten aufbewahrt, darauf in 2 Eppendorf-Cups verbracht und bei 14000 g 5 Minuten zentrifugiert. Der ganze Vorgang wurde bei 0°C durchgeführt. Der Überstand konnte als Probe in die Tests eingesetzt werden.

1. Glykogenbestimmung (nach ⁴³Keppler und Decker, 1974)

Wie oben angeführt, wurde von dem frisch hergestellten Homogenat 200 μl entnommen und mittels Amyloglucosidase in Glykosyleinheiten aufgespalten.

a. Aufspaltung in Glykosyleinheiten

2 ml	Acetatpuffer, pH 4,8
2 mg	Amyloglucosidase
200 μL	Probe (Homogenat)

wurden in einen verschließbaren Glaskolben gegeben und 2 Stunden bei 40°C in einem Wasserbad geschüttelt. Nach 2 Stunden wurde die Reaktion mit 200 μl eiskalter HClO_4 gestoppt; die Lösung wurde in Eppendorf-Cups 5 Minuten bei 14000 g zentrifugiert; der Überstand wurde in den Test als Probe eingesetzt.

b. Bestimmung der Glykosyteinheiten

500 μ l Puffer (24 mg ATP, 15 mg NADP in 10 ml H₂O)
 50 μ l Probe
 5 μ l G-6-PDH

wurden gemischt, dann wurde E₀ abgelesen; die Reaktion wurde mit 5 μ l HK gestartet und lief bei 25° C und Wellenlänge 366 nm ab.

Berechnung der Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (⁸Bergmeyer, 1970):

$$C = \frac{\Delta E \cdot KV \cdot (4 + (0,75 \cdot g \text{ Gewebeeinwaage}))}{PV \cdot \epsilon \cdot g \text{ Gewebeeinwaage}}$$

wobei

$$\Delta E = E_1 - E_0$$

KV = Küvettenvolumen

PV = Probevolumen

ϵ = Extinktionskoeffizient (welcher bei Wellenlänge E₃₆₆ und bei NADP als Reduktionsmittel 3,45 ist, bei E₃₆₆ und bei NAD als Reduktionsmittel 3,4 ist, bei E₃₃₄ 6,1 ist)

Die Konzentration von Glykogen in μ Mol/g Frischgewicht in Glukoseeinheiten berechnete sich aus der Differenz: Glukoseeinheiten (gemessen nach enzymatischer Aufspaltung des Homogenats) - Glukoseeinheiten (gemessen ohne enzymatische Aufspaltung des Homogenats).

2. Messung der D-Glukose (nach ⁸¹Slein, 1962)

Messung wie unter Glykogen beschrieben, nur wurde aus Konzentrationsgründen statt 50 μ l 100 μ l Probe eingesetzt.

3. Messung von Glukose-6-Phosphat (G-6-P) und Fruktose-6-Phosphat (F-6-P) (nach ⁴⁰Hohorst, 1968)

500 μ l Puffer (3,2 mg NADP in 10 ml Adeninnucleotidpuffer)

200 μ l Probe

wurden gemischt, dann wurde E_0 abgelesen; Start mit 5 μ l G-6-PDH (1:5 mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ verdünnt); die Reaktion lief bei 25° C und Wellenlänge 334nm ab; $E_1 - E_0$ ergab, in das bei der Glykogenbestimmung angeführte Lambert-Beersche gesetz eingesetzt, die Konzentration von G-6-P.

Dann Zugabe von 5 μ l Phosphoglucoseisomerase; $E_2 - E_1$ ergab, in das Lambert-Beersche Gesetz eingesetzt, die Konzentration von F-6-P in μ Mol/g Frischgewicht.

4. Messung von F-1-6-DP (nach ¹⁴Bücher und Hohorst, 1968)

a. Stammpuffer

9,283 g TRA wurden zu 100 ml H_2O gegeben und auf pH 7,6 eingestellt.

b. Testansatz

200 μ l Puffer (149 mg EDTA, 0,4 mg NADH wurden zu 10 ml Stammpuffer gegeben)

200 μ l Probe bzw. H_2O

5 μ l Glyc-3-PDH

wurden gemischt, dann wurde E_0 abgelesen; Start mit 5 μ l TIM + 5 μ l Aldolase; die Reaktion lief bei 25° C und Wellenlänge 334 nm ab; $\frac{1}{2} \cdot ((E_1 - E_0)_{\text{Probe}} - (E_1 - E_0)_{\text{H}_2\text{O}})$

ergab in das bei der Glykogenbestimmung angeführte Lambert-Beersche Gesetz eingesetzt, die Konzentration von F-1-6-DP in $\mu\text{Mol/g}$ Frischgewicht. Das Ergebnis mußte deshalb durch 2 dividiert werden, da aus einer Hexose 2 Trioseeinheiten entstehen.

5. Messung von Pyruvat und PEP (nach ²¹Czok, 1974)

a. Stammpuffer

Wie bei F-1-6-DP beschrieben!

b. Testansatz

200 μl Puffer (18,8 mg EDTA, 1,5 mg NADH wurden zu
10 ml Stammpuffer gegeben)

200 μl Probe bzw. H_2O

wurden gemischt, dann wurde E_0 abgelesen; Start mit 5 μl LDH (1:11 mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ verdünnt); die Reaktion lief bei 25°C und Wellenlänge 334 nm ab; $(E_1 - E_0)_{\text{Probe}} - (E_1 - E_0)_{\text{H}_2\text{O}}$ ergab in das bei der Glykogenbestimmung angeführte Lambert-Beersche Gesetz eingesetzt, die Konzentration von Pyruvat in $\mu\text{Mol/g}$ Frischgewicht.

Dann wurde folgendes dazugegeben:

5 μl ADP (14 mg/ ml H_2O)

10 μl MgSO_4 (123 mg/ ml H_2O)

10 μl KCl (112 mg/ ml H_2O)

wurden gemischt, dann wurde E_0 abgelesen; Start mit 5 μl PK; die Reaktion lief bei 25°C und Wellenlänge 334 nm ab. $(E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{H}_2\text{O}}$ ergab in das bei der Glykogenbestimmung angeführte Lambert-Beersche Gesetz eingesetzt die Konzentration von PEP in $\mu\text{Mol/g}$ Frischgewicht.

6. Bestimmung von Lactat (nach ³⁹Hochorst, 1968)

a. Testpuffer

7,5 g Glycin	wurden zu 100 ml H ₂ O gegeben
5,2 g Hydrazinsulfat	und mit 10 N KOH auf pH 9,5
0,2 g EDTA	eingestellt

b. Testansatz

500 μ l	Puffer
100 μ l	NAD (10 mg/ml H ₂ O)
50 μ l	Probe bzw. H ₂ O

wurden gemischt, dann wurde E₀ abgelesen; Start mit 10 μ l LDH; Reaktion lief bei 25° C und Wellenlänge 366 nm ab. (E₁ - E₀)_{Probe} - (E₁ - E₀)_{H₂O} ergab, in das bei der Glykogenbestimmung angeführte H₂O Lambert-Beersche Gesetz eingesetzt, die Konzentration von Lactat in μ Mol/g Frischgewicht.

7. Messung von ATP und Creatin-Phosphat (Cr-P) (nach ⁴⁵Lamprecht, 1974)

500 μ l	Puffer (15 mg NADP in 10 ml Adeninnucleotid-puffer)
50 μ l	Probe
30 μ l	Glucose (4 mg/ml H ₂ O)
5 μ l	G-6-PDH

wurden gemischt, dann wurde E₀ abgelesen; Start mit 5 μ l HK; die Reaktion lief bei 25° C und Wellenlänge 366nm ab; E₁ - E₀ ergab in das bei der Glykogenbestimmung angeführte Lambert-Beersche Gesetz eingesetzt die Konzentration von ATP in μ Mol/g Frischgewicht.

Dann:

50 μ l	Glucose (4 mg/ml H ₂ O)
100 μ l	ADP (5 mg/ml H ₂ O)

wurden gemischt, dann wurde E₂ abgelesen; Start mit 5 μ l Creatinphosphokinase (1mg/100 μ l (NH₄)₂SO₄); die Reaktion

lief bei 25° C und Wellenlänge 366 nm ab; $E_1 - E_0$ ergab in das bei der Glykogenbestimmung angeführte Lambert-Beersche Gesetz eingesetzt die Konzentration von Cr-P in μ Mol/g Frischgewicht.

8. Messung von ADP und AMP (nach ¹Adam, 1962)

500 μ l Puffer (2 mg EDTA; 6,8 mg ATP; 3,0 mg PEP;
2 mg NADH ; in 10 ml Adennucleotid-
puffer)

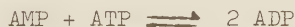
200 μ l Probe bzw. H_2O

5 μ l LDH (1:11 mit $(NH_4)_2SO_4$ verdünnt)

wurden gemischt, dann wurde E_0 abgelesen; Start mit PK; die Reaktion lief bei 25° C und Wellenlänge 334 nm ab; $(E_1 - E_0)_{Probe} - (E_1 - E_0)_{H_2O}$ ergab, in das bei der Glykogenbestimmung angeführte ² Lambert-Beersche Gesetz eingesetzt, die Konzentration von ADP in μ Mol/g Frischgewicht.

Dann:

Start mit 5 μ l Myokinase; die Reaktion lief bei 25° C und Wellenlänge 334 nm ab; $\frac{1}{2} ((E_2 - E_1)_{Probe} - (E_2 - E_1)_{H_2O})$ ergab, in das bei der Glykogenbestimmung angeführte Lambert-Beersche Gesetz eingesetzt, die Konzentration von AMP in μ Mol/g Frischgewicht. Faktor 1/2 deshalb, weil die Myokinase folgende Reaktion katalysiert:



V. Bestimmung von Glykogen, G-6-P, ATP, ADP, AMP und Cr-P in der Herzmuskulatur

Zu dieser Bestimmung wurde, nachdem Proben von Skelettmuskulatur - wie beschrieben - für die Substratmessung und Enzymaktivitätsmessung gewonnen wurden, der Thorax eröffnet und das Herz von den großen Gefäßen mit einer Schere abgetrennt . Das Herz wurde in gleicher Weise wie die Skelettmuskulatur aufgearbeitet.

VI. Intraperitoneale Glukosebelastung mit folgender Bestimmung von Glykogen in der Skelett- und Herzmuskulatur

Der Versuch, eine orale Glukosebelastung durchzuführen, war fruchtlos; mittels einer Magensonde wurde die Glukoselösung in den Magen eingeflößt; die Mehrzahl der Ratten reagierte auf das Einführen und besonders auf das Einbringen der Glukoselösung mit Atemstillstand. Wie folgende Sektion der Ratten zeigte, lag die Magensonde niemals in der Trachea; eine falsche Lage der Magensonde als Ursache für Atemstillstand mit konsekutivem Tod war somit ausgeschlossen. Eine intraperitoneale (i.p.) Glukosebelastung schien problemloser zu sein.

Dazu wurden die Ratten mit 60 mg / kg Nembutal^R (Pentobarbital) anästhesiert. Dann wurde die v. jugularis frei präpariert, ein Venenkatheter eingeführt und bis in Herznähe vorgeschoben. Als Venenkatheter diente ein weiches Plastikschlächchen mit 0,6 mm Durchmesser; um diesen Katheter durchspülen bzw. mit ihm Venenblut ansaugen zu können, wurde auf das Ende des Katheters eine 1 ml Spritze aufgesteckt; als Verbindungsstück zwischen Katheterende und Spritze wurde eine 0,55 x 25 mm Injektionsnadel gewählt. Um den Venenkatheter frei zu halten, wurde dieser vor dem Einführen mit Heparin gefüllt und anschließend mit 0,9% NaCl durchgespült, so daß höchstens eine Benetzung der Katheterinnenwände mit Heparin, aber keine systemische Wirkung von Heparin zu erwarten war. Während der Glukosebelastung wurde der Katheter durch Spülen mit 0,9% NaCl offengehalten. Blutproben wurden auf folgende Weise gewonnen: Blut wurde bis zum Katheterende mit Hilfe der Spritze angesaugt, dann wurde die Spritze mit Injektionsnadel vom Katheter abgezogen und das Blut mit einer 50 μ l Mikropipette abgesaugt; darauf wurde die Spritze mit der Injektionsnadel wieder auf den Katheter gesetzt und dieser mittels 0,9% NaCl-Lösung gespült; die Blutprobe in

der Mikropipette wurde in ein mit 200 μ l HClO_4 (0,9 N) gefülltes Eppendorf-Cup geblasen; diese bzw. die HClO_4 waren dadurch, daß die E-Cups in einem Eis-Wasser-Gemisch steckten, auf 0°C abgekühlt; damit keine Blutreste in der Mikropipette zurückblieben, wurde diese dreimal mit der im E-Cup befindlichen HClO_4 gespült; das E-Cup mit der Blutprobe wurde darauf wieder in das Eis-Wasser-Gemisch gegeben. Blut wurde 2 mal in Abständen von 10 Minuten vor der Glukosebelastung und 10 bzw. 15 bzw. 30 bzw. 60 bzw. 90 Minuten nach der i.p. Glukosebelastung abgenommen. Nachdem die letzte Blutprobe abgenommen war, wurde ein Stück Skelettmuskulatur vom Oberschenkel des linken Hinterbeines und das Herz für die Glykogen- bzw. Glukosebestimmung gewonnen. Die Methodik, angefangen beim Frierstopp, über die Homogenisierung, bis zur Substratmessung, ist bereits beschrieben worden. Die mit HClO_4 denaturierten Blutproben wurden 10 Minuten bei 14000 g zentrifugiert, der Überstand wurde als Probe in den bei der Substratbestimmung des Muskels beschriebenen Glukosetest eingesetzt.

I.p. Glukosebelastung:

1,75 g pro kg Körpergewicht wurden mit einer Spritze in das Abdomen injiziert. Dazu wurden die Bauchdecken angehoben und mit der Injektionsnadel durchstoßen; durch Aspiration konnte man sich von der intraperitonealen Lage der Injektionsnadel vergewissern; dann folgte die Injektion der 20% Glukoselösung.

Die Ratten, bei denen die Glukosebelastung durchgeführt wurde, waren auch weibliche Ratten vom Typ Wistar und erhielten 3 Wochen Clofibrat- (gleiche Zusammensetzung wie bei den anderen Versuchen) bzw. Kontrollfutter.

Als Vorversuche wurden je 2 Ratten 1,75 g Glukose pro kg Körpergewicht einer 20% Glukoselösung bzw. im Parallelversuch 0,9% NaCl-Lösung i.p. injiziert, um die Auswirkung einer i.p. Glukosebelastung bzw. einer i.p. Volu-

menbelastung (mittels einer 0.9% NaCl-Lösung) auf den Blutzucker nachzuprüfen.

Ergebnisse: siehe Tabelle 5 bzw. Abbildung 1!

VII. Materialien

Enzyme, Cofaktoren und Nucleotide wurden von der Boehringer Mannheim GmbH bezogen. Alle anderen Reagenzien wurden bei der Merck AG Darmstadt gekauft und hatten analytischen Reinheitsgrad.

VIII. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung diente der U-Test von Wilcoxon, Man und Whitney (⁷⁶Sachs, 1974).

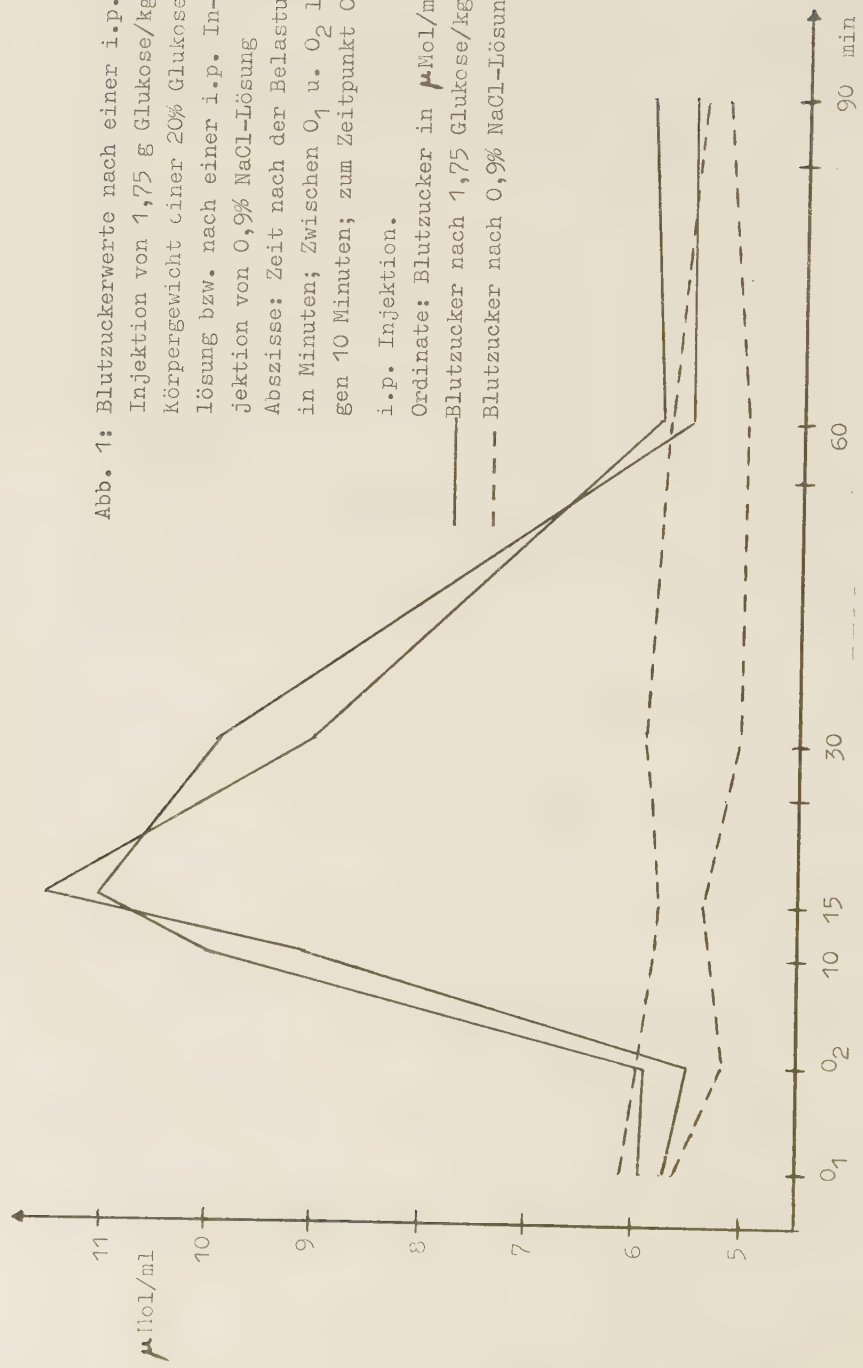
P-Werte wurden nur angegeben, wenn $p < 0,05$; in anderen Fällen - $p \geq 0,05$ - wurde n.s. angegeben, was heißt, daß keine statistische Signifikanz vorlag.

Tabelle 5: Blutzuckerwerte nach einer i.p. Injektion von 1,75 g Glukose/kg Körpergewicht einer 20% Glukoselösung bzw. nach einer i.p. Injektion von 0,9% NaCl- Lösung.

Zeit nach der Belastung in Minuten; zwischen O_1 u. O_2 liegen 10 Minuten (min)	Blutzuckerwerte nach i.p. Belastung mit 0,9% NaCl- Lösung $\frac{n_1}{n_2}$ (μ Mol/ml)	Blutzuckerwerte nach i.p. Belastung mit Glukoselösung $\frac{n_1}{n_2}$ (μ Mol/ml)
O_1	5,67/6,07	5,73/5,91
O_2	5,19/5,77	5,52/5,88
10	5,31/5,82	9,95/9,10
15	5,36/5,76	10,99/11,48
30	5,03/5,87	9,85/9,00
60	5,00/5,70	5,49/5,78
90	5,21/5,38	5,52/5,84

Abb. 1: Blutzuckerwerte nach einer i.p. Injektion von 1,75 g Glukose/kg Körpergewicht einer 20% Glukose-lösung bzw. nach einer i.p. Injektion von 0,9% NaCl-Lösung
 Abszisse: Zeit nach der Belastung in Minuten; Zwischen O_1 u. O_2 liegen 10 Minuten; zum Zeitpunkt O_2 i.p. Injektion.

Ordinate: Blutzucker in $\mu\text{Mol/ml}$.
 — Blutzucker nach 1,75 Glukose/kg
 - - - Blutzucker nach 0,9% NaCl-Lösung



D. E r g e b n i s s e

I. Ergebnisse der Messung der Aktivitäten von HK, PFK und PK nach 3 Wochen Fütterung mit Clofibrat:

Nach 3 Wochen Fütterung mit Clofibrat waren die maximalen in vitro gemessenen Aktivitäten der Hexokinase und der Phosphofructokinase etwas gesunken; diese Aktivitätsminderungen waren jedoch statistisch nicht signifikant. Die Aktivität der Pyruvatkinase der mit Clofibrat gefütterten Tiere zeigte keine Veränderung gegenüber der Aktivität der Pyruvatkinase von mit Kontrolldiät gefütterten Tieren (siehe Tabelle 6).

II. Konzentrationen der Metabolite der Glycolyse in der Skelettmuskulatur nach 3 Wochen Clofibrat:

Auf die Bestimmung der intrazellulären Glucosekonzentration musste aus technischen Gründen leider verzichtet werden. Zwar wurde der Glucosegehalt des Muskelgewebes gemessen, um die wahre Glykogenkonzentration zu ermitteln (der enzymatische Glykogentest gibt das Glykogen in Glucoseeinheiten an; siehe Methodik), andererseits aber ist dieser ermittelte Wert der Glucose keinesfalls identisch mit dem intrazellulären Glucosegehalt; denn jede Messung des Glucosegehalts von Gewebe erfaßt auch den extrazellulären Glucosegehalt (Interstitium, Gefäße). Dieses Problem kann dadurch überwunden werden, daß man mit einer Substanz, die nicht die Zellmembran durchdringen kann (zB. Sorbitol), den Extrazellulärraum bestimmt; der intrazelluläre Glucosegehalt läßt sich dann berechnen (genaue Methode: siehe ⁵⁷ Newsholme, 1974, Kap. 3, Appendix 3.5, S. 142). Diese indirekte Bestimmung der intrazellulären Glucose ist aber immer noch schwierig, wie die stark schwankenden Konzentrationsangaben in der

Tabelle 6:

Aktivitäten der Hexokinase (HK), Phosphofructokinase (PFK) und der Pyruvatkinase (PK) in Skelett-Muskel-Homogenaten nach 3 Wochen langer Fütterung mit Clofibrat.

Es sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M. angegeben. Die Dimension ist U/g Frischgewicht. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Versuchstiere an.

Enzyme	HK	PFK	PK
Kontrolle	0,564 $\pm$ 0,163 (10)	54,85 $\pm$ 13,48 (10)	295,70 $\pm$ 27,58 (10)
Clofibrat	0,498 $\pm$ 0,071 (11)	49,26 $\pm$ 15,20 (11)	295,54 $\pm$ 68,18 (11)
Diff. in % bez. der Kontrolle	-12	-10	0
p - Wert	n.s.	n.s.	n.s.

Literatur zeigen; wir haben deshalb auf die Bestimmung verzichtet. Nach 3 Wochen langer Fütterung mit Clofibrat konnte eine Konzentrationsverminderung aller Metabolite der Glykolyse einschließlich Glykogen beobachtet werden. Signifikant war der Konzentrationsabfall bei Glykogen, Glucose-6-Phosphat, Fructose-1 6 diphosphat, Fructose-6-Phosphat und Lactat. Weiterhin ist die Summe der Konzentrationen von Lactat und Pyruvat abgefallen. Die Verkleinerung des Quotienten Lactat/Pyruvat von 22,0 der Kontrollgruppe auf 17,3 der Clofibrat-Gruppe zeigt einen verminderten NADH/NAD Quotienten an; nämlich es wurde auch in der Leber gefunden (⁵⁹ Platt, 1966).

Ergebnisse: siehe Tabelle 7!

III. Gehalt des Skelettmuskels an Adenosin-Phosphaten und an Kreatin-Phosphat nach 3 Wochen Clofibrat:

Der Gehalt an Adenosintriphosphat (ATP), Kreatinphosphat (Cr-P) und Adenosindiphosphat (ADP) stieg an, während der von Adenosinmonophosphat (AMP) abgefallen ist. Keine dieser Veränderungen war signifikant. Die Summe der Adennucleotide stieg leicht an, ebenfalls der ATP/ADP-Quotient; die Energy-charge (Definition siehe Tab. 8) blieb praktisch unverändert.

Ergebnisse: siehe Tabelle 8!

IV. Gehalt der Skelettmuskulatur an Metaboliten der Glykolyse nach 6 Wochen Clofibrat:

Nach 6 Wochen langer Fütterung mit Clofibrat zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe eine Verminderung von Glykogen, Glukose-6-Phosphat, Fruktose-1-6-diphosphat und Pyruvat. Signifikant war dieser Konzentrationsabfall nur bei Glykogen und Pyruvat. Im Gegensatz zu dem 3 wöchigen Ver-

Tabelle 7:

metaboliten der Glykolyse im Skelettmuskel nach 3 Wochen langer Fütterung mit Clofibrat.

Die Konzentrationen geben die Mittelwerte $\pm$ S.E.M. wieder. Die Dimension der Konzentrationen ist angegeben in μ Mol/g Frischgewicht.

	Glykogen	G-6-P	F-6-P	F-1-6-DP	PEP	Pyr	Lac	Lac + Pyr
Kontrolle (n = 10)	30,72 $\pm 2,22$	0,545 $\pm 0,05$	0,105 $\pm 0,011$	0,201 $\pm 0,018$	0,023 $\pm 0,005$	0,064 $\pm 0,008$	1,42 $\pm 0,13$	1,484
Clofibrat (n = 11)	22,01 $\pm 1,85$	0,426 $\pm 0,04$	0,077 $\pm 0,055$	0,129 $\pm 0,012$	0,015 $\pm 0,002$	0,062 $\pm 0,009$	1,07 $\pm 0,09$	1,132
Diff. in % bez. der Kontrolle	-28,4	-21,8	-26,7	-35,8	-34,8	-3,1	-24,6	-23,7
p - Wert	0,01	0,025	0,05	0,005	n.s.	n.s.	0,05	

Tabelle 8:

Genalt des Skelettmuskels an Adenosinphosphaten und Kreatinphosphat (Cr-P) nach 3 Wochen Clofibrat.

Dimension der Konzentration in μ Mol/g Frischgewicht. Es werden die Mittelwerte $\pm$ S.E.M. angegeben. Energy-Charge wurde nach Atkinson berechnet (Atkinson, 1968).

$$E_A = \frac{(ATP) + (ADP/2)}{(ATP + ADP + AMP)}$$

	ATP	ADP	AMP	Cr-P	Summe der Adenin- nucleotide	ATP/ADP	Energy- Charge
Kontrolle (n = 10)	5,508 $\pm 0,418$	0,718 $\pm 0,089$	0,047 $\pm 0,013$	14,394 $\pm 1,806$	6,273	7,671	0,935
Clofibrat (n = 11)	5,815 $\pm 0,781$	0,721 $\pm 0,055$	0,037 $\pm 0,014$	15,507 $\pm 1,488$	6,573	8,065	0,939
Diff. in % bez. der Kontrolle	+5,6	+0,4	-21	+7,7			
p - Wert	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			

such mit Clofibrat konnte man nach 6 Wochen Clofibrat einen Anstieg von Fructose-6-Phosphat (F-6-P) und Lactat beobachten. Ebenfalls im Gegensatz zu 3 Wochen Clofibrat zeigte sich nach 6 Wochen Clofibrat ein Anstieg des Lactat/Pyruvat Quotienten (Clofibratgruppe: 31,7; Kontrollgruppe: 20,3).

Ergebnisse: siehe Tabelle 9!

V. Gehalt der Skelettmuskulatur an Adenosinphosphaten und an Kreatinphosphat nach 6 Wochen Clofibrat

Die Ergebnisse nach 6 Wochen Clofibrat bezüglich der Adenosinphosphate und Kreatinphosphat verhalten sich konträr gegenüber denjenigen, die nach 3 Wochen Clofibrat erhalten wurden. Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP) und Kreatinphosphat (Cr-P) sind abgefallen, während Adenosinmonophosphat (AMP) angestiegen ist. Die Summe der Adennucleotide ist gesunken, ebenfalls sank der ATP/ADP Quotient und die Energy-Charge.

Ergebnisse: siehe Tabelle 10!

VI. Auslaßversuch

Um zu sehen, ob der beobachtete Glykogenabfall reversibel ist, wurden Ratten zuerst 3 Wochen mit Clofibrat-Diät gefüttert; nach dieser Zeit wurde Clofibrat abgesetzt und Kontrollfutter gegeben. Nach einer Woche Absetzen von Clofibrat stieg die Glykogenkonzentration der Skelettmuskulatur von $22,01 \pm 1,85 \mu\text{Mol/g}$ Frischgewicht (siehe Tabelle 7) auf $26,32 \pm 4,80 \mu\text{Mol/g}$ Frischgewicht ($n = 4$). Nach zwei Wochen Absetzen von Clofibrat stieg die Glykogenkonzentration der Skelettmuskulatur weiter an auf $27,44 \pm 3,79 \mu\text{Mol/g}$ Frischgewicht ($n = 5$).

Tabelle 9:

Gehalt des Skelettmuskels an Metaboliten der Glykolyse nach 6 Wochen Clofibrat.

Angabe sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M.. Dimension ist $\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht.

	Glykogen	G-6-P	F-6-P	F-1-6-DP	Pyruvat	Lactat	Lac + Pyr
Kontrolle (n = 9)	24,08 $\pm 3,618$	0,921 $\pm 0,172$	0,118 $\pm 0,028$	0,175 $\pm 0,050$	0,109 $\pm 0,021$	2,211 $\pm 0,478$	2,320
Clofibrat (n = 9)	19,28 $\pm 1,503$	0,791 $\pm 0,131$	0,143 $\pm 0,042$	0,149 $\pm 0,015$	0,072 $\pm 0,022$	2,283 $\pm 0,907$	2,355
Diff. in % bez. der Kontrolle	-19,9	-14,1	+21,2	-14,8	-33,9	+3,2	+1,5
p - Wert	0,025	n.s.	n.s.	n.s.	0,005	n.s.	

Tabelle 10:

Gehalt der Skelettmuskulatur an Adenosin-Phosphaten und Kreatin-Phosphat (Cr-P) nach 6 Wochen Clofibrat.

Dimension der Konzentrationen in μ Mol/g Frischgewicht. Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M.. Die Energy-Charge wurde nach Atkinson berechnet (Atkinson, 1968).

$$E_A = \frac{(\text{ATP}) + (\text{ADP}/2)}{(\text{ATP}) + (\text{ADP}) + (\text{AMP})}$$

	ATP	ADP	AMP	Cr-P	Summe der Adenin- nucleotide	ATP/ADP	Energy- Charge
Kontrolle (n = 9)	5,945 $\pm 0,350$	0,788 $\pm 0,049$	0,053 $\pm 0,024$	14,433 $\pm 1,972$	6,786	7,544	0,934
Clofibrat (n = 9)	4,842 $\pm 0,417$	0,761 $\pm 0,057$	0,054 $\pm 0,017$	12,224 $\pm 1,719$	5,657	6,363	0,923
Diff. in % bez. der Kontrolle	-18,5	-3,4	+0,9	-15,3			
t-Wert	0,001	n.s.	n.s.	0,025			

VII. Gehalt der Herzmuskulatur an Glykogen, Adenosinphosphaten und Kreatinphosphat (Cr-P) nach 3 Wochen Clofibrat

Wie im Skelettmuskel, so fiel auch im Herzmuskel die Konzentration des Glykogens signifikant ab. Das Gesamtgewicht des Herzens zeigte keinen Unterschied zwischen Kontrollgruppe ($0,654 \pm 0,14$ g, Mittelwert $\pm$ S.E.M.) und der Clofibratgruppe ($0,645 \pm 0,07$ g, Mittelwert $\pm$ S.E.M.).

Anders als im Skelettmuskel war Kreatinphosphat (Cr-P) schon nach 3 Wochen Clofibrat gesunken.

Ähnliche Veränderungen wie im Skelettmuskel zeigten die Adeninucleotide: Adenosintriphosphat (ATP) stieg an, Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) fielen ab.

Der ATP/ADP Quotient und die Energy-Charge stiegen an.

Ergebnisse: siehe Tabelle 11!

VIII. Gehalt der Herzmuskulatur an Glykogen, Glukose-6-Phosphat, Adeninucleotiden und Kreatinphosphat (Cr-P) nach 6 Wochen Clofibrat

Zusätzlich zu Glykogen wurde noch Glukose-6-Phosphat bestimmt; beide Metaboliten der Glukose fielen - wie auch im Skelettmuskel - ab.

Der Gehalt an Adenosintriphosphat (ATP), Kreatinphosphat (Cr-P) und Adenosinmonophosphat (AMP) ist gesunken, derjenige von Adenosindiphosphat (ADP) gestiegen. Keines dieser Ergebnisse war jedoch signifikant.

Ergebnisse: siehe Tabelle 12!

Tabelle 11:

Gehalt der Herzmuskulatur an Glykogen, Adenosinphosphaten und Kreatin-Phosphat (Cr-P) nach 3 Wochen Clofibrat.

Die Dimension der Konzentrationen ist μ Mol/g Frischgewicht. Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M.. Die Energy-Charge wurde nach Atkinson berechnet (⁵Atkinson, 1968):

$$E_A = \frac{(ATP + ADP/2)}{(ATP + ADP + AMP)}$$

	Glykogen	Cr-P	ATP	ADP	AMP	Summe der Adenin-nucleotide	ATP/ADP	Energy-Charge
Kontrolle (n = 10)	25,08 $\pm 5,60$	3,233 $\pm 1,900$	4,208 $\pm 1,061$	2,027 $\pm 0,384$	0,443 $\pm 0,181$	6,678	2,076	0,782
Clofibrat (n = 11)	17,72 $\pm 4,24$	2,530 $\pm 0,677$	4,509 $\pm 1,216$	2,009 $\pm 0,299$	0,314 $\pm 0,124$	6,832	2,244	0,810
Diff. in % bez. der Kontrolle	-29,3	-21,7	+7,2	-0,9	-29,1			
p - Wert	0,005	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			

Tabelle 12:

Gehalt der Herzmuskulatur an Glykogen, Glukose-6-Phosphat (G-6-P), Adeninnukleotiden und Kreatin-Phosphat (Cr-P) nach 6 Wochen Clofibrat.

Die Dimension der Konzentrationen ist $\mu\text{Mol/g Frischgewicht}$. Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M..

	Glykogen	G-6-P	ATP	ADP	AMP	Cr-P	Summe der Adenin- nukleotide	ATP/ADP
Kontrolle (n = 9)	22,145 $\pm$ 5,346	0,234 $\pm$ 0,043	3,349 $\pm$ 0,378	2,213 $\pm$ 0,171	0,575 $\pm$ 0,085	1,314 $\pm$ 0,369	6,137	1,513
Clofibrat (n = 9)	17,271 $\pm$ 3,329	0,212 $\pm$ 0,181	2,954 $\pm$ 0,506	2,223 $\pm$ 0,270	0,410 $\pm$ 0,110	1,027 $\pm$ 0,369	5,587	1,329
Diff. in % bez. der Kontrolle	-22,0	-9,4	-11,8	+0,4	-28,7	-21,8		
p - Wert	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		

IX. Intraperitoneale Glukosebelastung mit darauffolgender Gly-
kogenbestimmung in Herz- und Skelettmuskulatur nach 3 Wo-
chen Clofibrat

Die Clofibratgruppe zeigte gegenüber der Kontrollgruppe eine verschlechterte Glukosetoleranz nach einer i.p. Glukosebelastung. Kein Wert zeigte jedoch eine Signifikanz. Ergebnisse: siehe Tabelle 13 und Abb. 2!

Die nach der Glukosebelastung bestimmten Glykogenwerte, sowohl in der Skelett- als auch in der Herzmuskulatur waren in der Clofibratgruppe niedriger als in der Kontrollgruppe - wie in allen vorher beschriebenen Experimenten. Jedoch zeigte die Glykogenkonzentration nach der Glukosebelastung keinen signifikanten Unterschied zwischen Clofibrat- und Kontrollgruppe (im Gegensatz zu den vorhergegangenen Experimenten); weiterhin war der %uale Unterschied in der Glykogenkonzentration zwischen Clofibrat- und Kontrollgruppe nach vorausgegangener Glukosebelastung kleiner (- 16,1% beim Skelettmuskel; - 10,8% beim Herzmuskel) als ohne vorausgegangener Glukosebelastung (- 28,4% beim Skelettmuskel; - 29,3% beim Herzmuskel).

Siehe Tabellen 7, 11 und 14! (Tab 7 = S.32, Tab 11 = S.38)

Tabelle 13:

Intraperitoneale (i.p.) Glukosebelastung mit 1,75 g Glukose/kg Körpergewicht einer 20% Lösung nach 3 Wochen Clofibrat.

Die Zahlen über der Abszisse bedeuten die Minuten nach der i.p. Glukosebelastung; zwischen O_1 und O_2 liegen 10 Minuten; zum Zeitpunkt O_2 i.p. Belastung. Die Dimension der Konzentrationen ist μ Mol/ml Blut; angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M..

	O_1	O_2	10	15	30	60	90
Kontrolle (n = 5)	6,347 $\pm 0,628$	6,000 $\pm 0,539$	10,150 $\pm 0,787$	10,402 $\pm 0,948$	7,896 $\pm 0,989$	5,393 $\pm 0,559$	5,538 $\pm 0,321$
Clofibrat (n = 5)	6,509 $\pm 0,570$	5,921 $\pm 0,524$	10,443 $\pm 2,465$	11,194 $\pm 2,437$	9,232 $\pm 3,169$	6,164 $\pm 0,881$	5,876 $\pm 0,338$
Diff. in % bez. der Kontrolle	+2,6	-1,3	+2,9	+7,6	+16,9	+14,3	+6,1
p - Wert	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Abb. 2: Blutzuckerwerte in $\mu\text{Mol/ml}$ nach einer i.p. Glukosebelastung mit 1,75 g Glukose/kg Körpergewicht. Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ S.E.M. Zwischen O_1 und O_2 liegen 10 Minuten, zum Zeitpunkt O_2 i.p. Glukoseinjektion. --- Blutzucker bei Clotibratratten — Blutzucker bei Kontrollratten

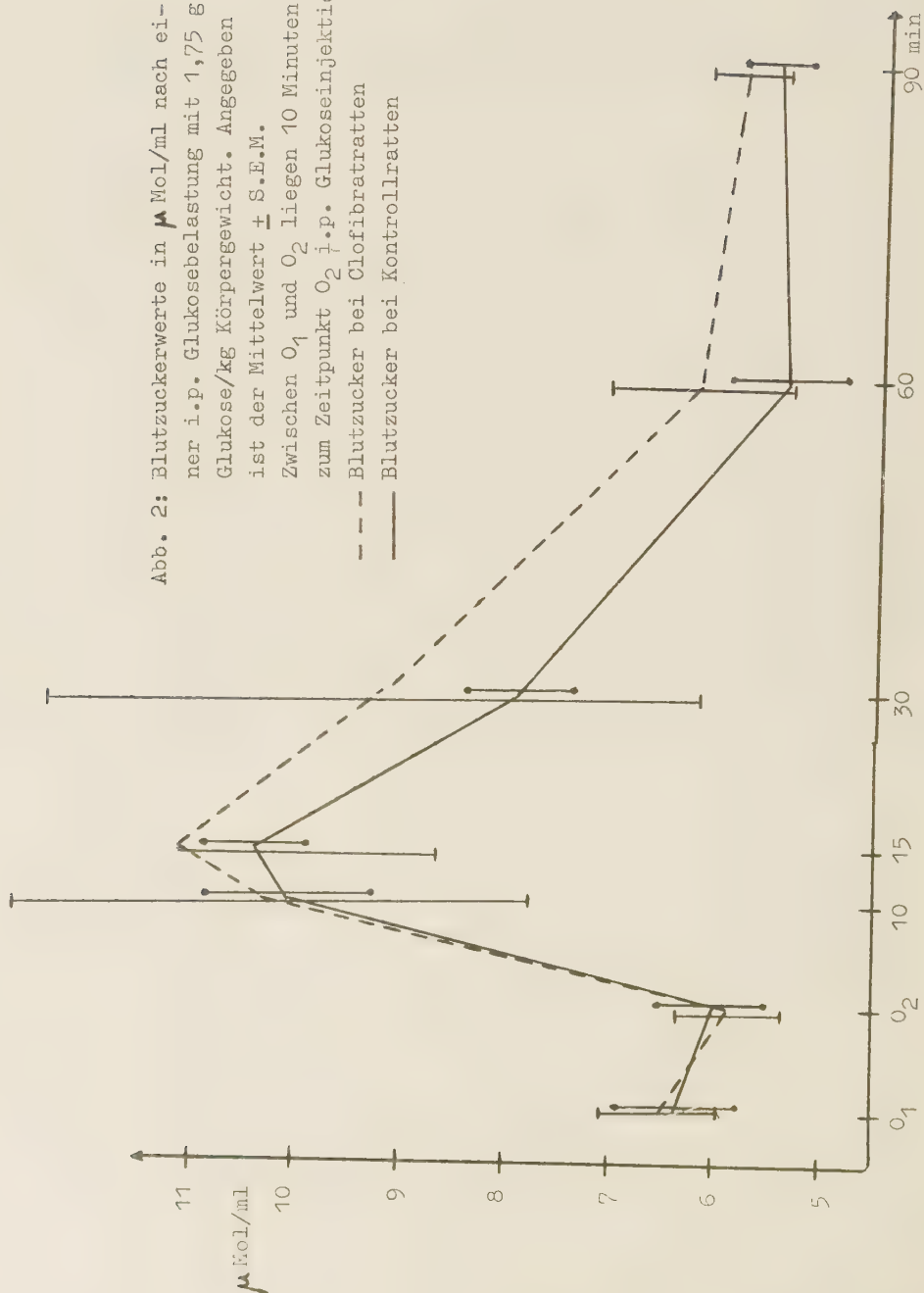


Tabelle 14:

Glykogengehalt des Skelett- und Herzmuskels unmittelbar nach einer vorausgegangenen intraperitonealen (i.p.) Glukosebelastung mit 1,75 g Glukose/kg Körpergewicht einer 20% Glukoselösung.

Dimension der Konzentrationen ist μ Mol/g Frischgewicht. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M..

	Glykogen Skelettmuskel	Glykogen Herzmuskel
Kontrolle (n = 5)	30,661 $\pm$ 6,920	29,359 $\pm$ 4,845
Clofibrat (n = 5)	25,712 $\pm$ 4,039	26,179 $\pm$ 9,945
Diff. in % bez. der Kontrolle	-16,1	-10,8
p - Wert	n.s.	n.s.

E. D i s k u s s i o n

I. Clofibrat und dessen Einwirkung auf die Glykolyse

1. Veränderung der Schlüsselenzyme (HK, PFK, PK) der Glykolyse durch Clofibrat

a. Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich, liegen nur Einzeldaten über Enzymveränderungen in verschiedenen Geweben unter Clofibrat vor. In unseren Versuchen zeigte sich nach 3 Wochen Clofibrat eine Aktivitätsverminderung der HK u. PFK, während die der PK unverändert blieb. Ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren ist nur mit Einschränkungen möglich, da in der von 1967-77 gesichteten Literatur nur Arbeiten über die Schlüsselenzyme der Glykolyse in der Rattenleber (⁹⁹Wilkening und Schwandt, 1977; ¹⁰³Zakim, 1974), im Jejunum des Menschen (¹⁰⁴Zakim, 1969) und im Fettgewebe des Menschen (⁴⁹Lufkin, 1974), **n i c h t** jedoch Untersuchungen über diese regulatorischen Enzyme in der Skelettmuskulatur von Ratten existieren. Bei den oben genannten Arbeiten lag übereinstimmend eine Aktivitätsminderung von PFK und PK vor, während die HK unverändert blieb; eine Übereinstimmung mit unseren Experimenten zeigt sich also nur bei der Aktivität von PFK.

b. Deutung der Aktivitätsänderung

Auf welche Weise Clofibrat die Aktivität von Enzymen beeinflusst, ist nicht bekannt. In vitro Versuche ergaben, daß Clofibrat die L-Glycerol-3-Phosphat-acyl-transferase hemmt (⁴⁴Lamb und Fallon, 1972). ⁹⁹Wilkening und Schwandt konnten nachweisen, daß Clofibrat die Glukokinase, die HK, die PFK und die PK aus Rattenleber hemmt; diese Inhibition war aber erst ab Konzentrationen von 10 mM bemerkbar; diese Konzentration aber bei weitem die Plasmakonzentration, welche man bei Tieren findet (0,5-0,8 mM), die mit

einer 0,25% Clofibrat-Diät gefüttert wurden (⁷Barett, 1968). ⁹⁵Weber (1966) konnte zeigen, daß in der Leber die Synthese der PFK und der PK durch Insulin induziert wird; ebenfalls eine Aktivitätserhöhung der PFK und der PK in der Leber durch Insulin fand Taunton (⁸⁵Taunton, 1972); diese Aktivitätserhöhung war nicht durch eine de novo Synthese, da sie innerhalb von Minuten zu beobachten war, sondern durch einen anderen, unbekannten Mechanismus bedingt. Clofibrat erniedrigt sowohl die basale als auch die durch Glukose oder Glukagon stimulierte Konzentration an immuno-reaktiven Insulin (⁹⁶Weis, 1973). ²⁶Eaton (1973) beobachtete, daß Clofibrat die durch Arginin induzierte Insulinsekretion vermindert und die gleichzeitige Glukagonsekretion verstärkt und somit einen kleineren Insulin/Glukagon (I/G) Quotienten bedingt. Zumindest in der Leber kann die Aktivitätsminderung der Enzyme der Glykolyse durch eine Stoffwechselsituation, in der der Basalspiegel von Insulin bzw. der I/G Quotient vermindert ist, erklärt werden. Allerdings wird, was die S k e l e t t m u s k u l a t u r betrifft, dem Insulin keine Beeinflussung der Enzyme der Glykolyse zugeschrieben (⁵⁷Newsholme, 1974).

c. Bedeutung der Aktivitätsänderung der Schlüsselenzyme für den flux der Glykolyse

Wie beim kurzen Abriß über die Glykolyse dargestellt, sind die Schlüsselenzyme die Kontrollpunkte des Stoffwechsels, indem sie durch ihre Aktivität den flux eines Stoffwechselweges regulieren. Die Aktivitätsminderung der HK und PFK könnte somit einen verringerten flux der Glykolyse bedingen. Andererseits bedeutet eine verminderte Aktivität der HK nicht notwendigerweise einen verminderten flux der Glykolyse, da Glukose-6-Phosphat nicht nur ein Produkt der HK ist, sondern auch aus dem Glykogenabbau stammen kann, dh. auch bei reduzierter Aktivität der HK ist ein gesteigerter flux der Glykolyse möglich, wenn der Glykogenabbau gesteigert ist (Hinweise hierfür liegen vor: s. Abschnitt über Glykogen). Weiterhin ist die in vitro ge-

gemessene Aktivität von Enzymen nicht gleich der in vivo vorliegenden Aktivität (⁵⁷Newsholme, 1974). Trotz der in vitro gemessenen reduzierten Aktivität ist also ein gesteigerter flux möglich. Weitere Informationen über den Einfluß von Clofibrat auf den flux der Glykolyse sollen uns die Metabolite und Modifikatoren der Glykolyse geben.

2. Veränderungen der Metabolite der Glykolyse durch Clofibrat

a. Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren

Clofibrat reduzierte den Gehalt an glykolytischen Metaboliten in der Skelettmuskulatur; diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit denen von ⁵²Miyazawa (1975) und ⁹⁹Wilkening und Schwandt (1977), welche die Metaboliten der Glykolyse in der Leber von Ratten untersuchten. Weitere Arbeiten sind in der Literatur nicht vorhanden.

b. Bedeutung der Veränderungen der Metabolite für den flux der Glykolyse

⁹⁹Wilkening und Schwandt (1977) deuteten den reduzierten Metabolitgehalt mit einem gesteigerten flux der Glykolyse. Diese Interpretation eines gesteigerten flux' wird dadurch bekräftigt, daß man bei einer gesteigerten Glykolyse einen verringerten Glukose-6-Phosphat-Gehalt findet (⁵⁷Newsholme, 1974) und weiterhin dadurch, daß Clofibrat eine gesteigerte Oxidation von 1-¹⁴C-Glukose bewirkt (³³Gans, 1971).

3. Veränderungen der Modifikatoren der Glykolyse (Adenin-nucleotide, Kreatinphosphat (Cr-P), Energy-Charge) durch Clofibrat und die Bedeutung deren Veränderungen für den flux der Glykolyse

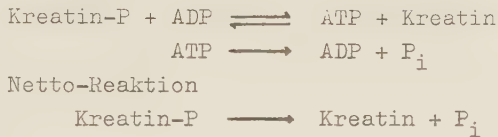
In der Einleitung wurde darauf hingewiesen, daß wir die energiereichen Phosphate aus folgenden 2 Gründen gemessen haben:

1. Eine Interferenz von Clofibrat mit der Glykolyse läßt auch eine Interferenz von Clofibrat mit den energiereichen Phosphaten erwarten

2. Die energiereichen Phosphate spielen eine große Rolle in der Regulation der Glykolyse.

Im folgenden Abschnitt werden nur die Veränderungen der energiereichen Phosphate und deren Bedeutung für den flux der Glykolyse abgehandelt.

Die PFK und indirekt die HK (eine Aktivitätssteigerung bzw. -reduzierung der PFK bedingt eine Aktivitätssteigerung bzw. -reduzierung der HK durch Konzentrationsabfall bzw. -anstieg von Glukose-6-Phosphat (⁵⁷Newsholme, 1974)) werden durch ATP, AMP und P_i (anorganisches Phosphat) modifiziert, wobei P_i aus folgender Reaktion herkommen kann:



Nach 3 Wochen Clofibrat war bei uns ein Anstieg von ATP und Kreatin-P (und damit ein Abfall von P_i) und ein Abfall von AMP, nach 6 Wochen Clofibrat dagegen ein Abfall von ATP und Kreatin-P (und damit ein Anstieg von P_i) und ein Anstieg von AMP zu beobachten. Die Ergebnisse nach 3 Wochen Clofibrat würden eher zu einer verminderten Glykolyserate, diejenigen nach 6 Wochen zu einer gesteigerten Glykolyserate passen. Denn die Aktivität der PFK (und damit indirekt die Aktivität der HK) wird durch ATP gehemmt (⁴⁷Lardy u. Parks, 1956) und durch AMP und P_i stimuliert (⁵¹Mansour, 1963; ⁶⁵Passoneau, 1962; ⁹⁰Underwood, 1965).

Im Hinblick auf den Einfluß, den Adeninnucleotide auf zahlreiche Enzyme, welche Energie hervorbringende oder Energie beanspruchende Prozesse katalysieren, ausüben, vermutet Atkinson (⁵Atkinson, 1968), daß die Balance der Konzentrationen der Adeninnucleotide ein wichtiger regulatorischer Faktor in diesen Prozessen sei. Diese Balan-

ce gibt der Energie-Status an. Zur Abschätzung des Energie-Status der Zelle führt Atkinson einen Parameter ein, den er Energy-Charge der Adeninnucleotide nennt:

$$E_A = \frac{(ATP + ADP/2)}{(ATP + ADP + AMP)}$$

Die Energy-Charge ist bei uns nach 3 Wochen Clofibrat gestiegen, nach 6 Wochen gefallen. In der Rattenleber wurde bereits nach 3 Wochen Clofibrat ein Abfall der Energy-Charge beobachtet (⁹⁹Wilkening und Schwandt, 1977).

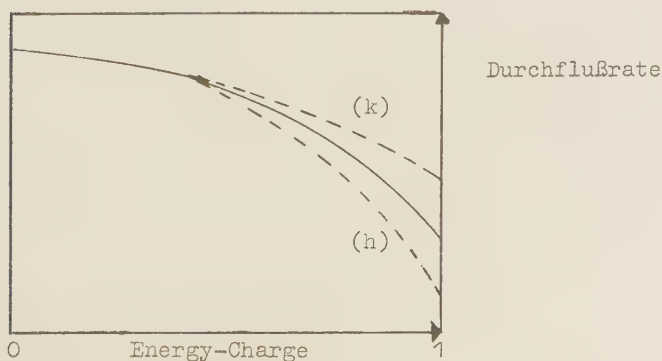
Wenn man nun die Enzymaktivität von Reaktionen, welche in ATP regenerierende Stoffwechselwege eingeschaltet sind, als Ordinate bezüglich der Abszisse, welche die Energy-Charge darstellt, aufträgt, ergibt sich eine Kurve, welche nach unten konvex ist, dh. eine hohe Energy-Charge läßt eine verminderte Enzymaktivität erwarten. Die PFK nimmt, obwohl sie ATP als Substrat hat, an einem Stoffwechselweg (der Glykolyse) teil, welcher letzten Endes eine ATP-Regeneration bewirkt. Eine hohe Energy-Charge würde somit über eine Aktivitätsminderung der PFK eine verminderte Glykolyserate zur Folge haben. Somit würde man (in unseren Experimenten) nach 3 Wochen Clofibrat eher eine verminderte Glykolyserate und erst nach 6 Wochen eine gesteigerte Glykolyserate vermuten.

Andererseits stellt die Glykolyse einen Stoffwechselweg dar, welcher nicht nur ATP regeneriert, sondern auch primäre Intermediärprodukte liefert. Deshalb kann eine Auffüllung des Pools mit Intermediärprodukten nicht von einer ATP-Regeneration getrennt werden. ²³Davis (1961) gibt solchen Stoffwechselwegen den Terminus amphibolisch, um nachdrücklich auf das Überlappen dieser Funktionen hinzuweisen. Falls derartige Stoffwechselwege also von der Energy-Charge allein kontrolliert würden, wäre die Konsequenz, daß eine Auffüllung des Pools mit Intermediärprodukten begrenzt wäre, wenn die Energy-Charge hoch ist. Eine hohe Energy-Charge würde somit Biosynthesen

inhibieren. Um dies zu umgehen, wird angenommen, daß eine Interaktion zwischen Energy-Charge und Intermediärprodukten im Sinne einer feedback-Regulation besteht (⁵Atkinson, 1968). Einige beobachtete Effekte werden dieser Forderung gerecht, so z.B. die Hemmung der PFK durch Ziträt (⁶⁵Passoneau, 1963; ³⁴Garland, 1963; ⁶³Parmeggiani, 1963). Die erwartete Interaktion zwischen der Energy-Charge und der feedback-Regulation durch Intermediärprodukte (welche durch amphibolische Stoffwechselwege bereitgestellt werden) ist in der Abbildung 3 illustriert. Ein Abfall der Modifikatoren bewirkt eine Verringerung der Konvexität, d.h. es resultiert eine beschleunigte Durchflußrate gegenüber eines Zustandes mit gleicher Energy-Charge, aber normaler Konzentration an primären Intermediärprodukten. Umgekehrt bewirkt ein Anstieg der Modifikatoren (primäre Intermediärprodukte) eine verstärkte Konvexität, d.h. es resultiert eine verminderte Durchflußrate gegenüber eines Zustandes mit gleicher Energy-Charge, aber normaler Konzentration an primären Intermediärprodukten. Dieser jeweilige Anstieg bzw. Abfall an Modifikatoren (primäre Intermediärprodukte) ist durch einen Anstieg bzw. Abfall der Durchflußraten anderer Stoffwechselwege bedingt.

Abb. 3: Interaktion zwischen Energy-Charge und der Konzentration von Modifikatoren auf die Durchflußrate eines amphibolischen Stoffwechselweges.

Die Kurven korrespondieren zu hohen (h), normalen (n) und kleinen (k) Konzentrationen der Modifikatoren (nach ⁵Atkinson, 1968).



Die Durchflußrate der Glykolyse wird im perfundierten isolierten Rattenherzmuskel oder im isolierten Rattenzwerchfellmuskel durch das Angebot von Fettsäuren im Perfusionsmedium gedrosselt (⁵⁷Newsholme, 1974). Durch verschiedene Experimente belegt, besteht der indirekte Beweis, daß nicht die Fettsäuren per se eine Hemmung der Glykolyse bewirken, sondern das aus deren Abbau resultierende Zitrat; (zB. die Effekte der Fettsäuren auf die Glykolyse sind nicht zu beobachten, wenn der Abbau der Fettsäuren durch Atmungskettenblocker verhindert wird (⁷¹Randle, 1958; ⁵⁸Newsholme, 1964); eine Akkumulation von Zitrat durch Fluoroacetat (Fluoroacetat hemmt die Aconitase kompetitiv und führt so zur Akkumulation von Zitrat) hemmt die Glykolyse (¹⁰Bowman, 1964)).

Clofibrat senkt den Plasmaspiegel der freien Fettsäuren (FFA) (⁷Barett, 1968; ¹⁸Cenedella, 1968; ²⁹Fenderson, 1974; ⁹²Vester, 1970). Eine in vitro Inhibition der Carnitin-stimulierten Palmitat-Utilisation in isolierten Herzmitochondrien wurde von ⁸³Stein (1976) gefunden. Ebenfalls eine reduzierte Palmitat-Oxidation beobachtete ⁶⁶Paul (1977) in Muskelhomogenaten des Musculus gastrocnemius der Ratte nach 2 Wochen oraler Zufuhr von täglich 350 mg Clofibrat/kg Körpergewicht. Diese Daten zeigen an, daß Clofibrat in vivo und in vitro den Abbau der Fettsäuren hemmt. Die verminderte Fettsäureutilisation und die beobachtete Senkung der FFA im Serum könnte zu einer Verringerung von Citrat führen und damit die oben angeführte Interaktionskurve (beziehung zwischen Energy-Charge und feedback-Modifikatoren) "nach oben" heben (Kurve, welche zu kleinen (k) Konzentrationen von feedback-Modifikatoren gehört). Dies bedeutet also, daß trotz der in unseren Experimenten beobachteten leicht erhöhten Energy-Charge nach 3 Wochen Clofibrat eine gesteigerte Glykolyserate möglich ist.

4. Zusammenfassende Betrachtung der unter 1, 2 und 3 angeführten Veränderungen für den flux der Glykolyse

Für einen gesteigerten flux spricht:

1. der Konzentrationsabfall der Metabolite der Glykolyse (insbesondere der von Glukose-6-Phosphat)
2. der Abfall von ATP und Kreatin-Phosphat, der Anstieg von AMP nach 6 Wochen Clofibrat
3. der Abfall der Energy-Charge der Adeninnucleotide nach 6 Wochen Clofibrat.

Gegen einen gesteigerten flux spricht:

1. der Aktivitätsabfall der HK und PFK, mit folgendem Einwand: auch bei Aktivitätsminderung der HK steht Glukose-6-Phosphat über den Abbau von Glykogen für die Glykolyse zur Verfügung; weiterhin, die in vitro gemessenen Aktivitäten von Enzymen sind nicht identisch mit denen in vivo.
2. der Anstieg von ATP und Kreatin-Phosphat und der Abfall von AMP nach 3 Wochen Clofibrat, deren Werte allerdings nicht signifikant waren
3. der Anstieg der Energy-Charge nach 3 Wochen Clofibrat, mit folgendem Einwand: die von anderen Autoren beobachtete Veränderung von Modifikatoren der Energy-Charge (FFA und deren Abbauprodukt Zitrat), so daß auch bei erhöhter Energy-Charge ein gesteigerter flux der Glykolyse möglich ist.

II. Clofibrat und dessen Wirkung auf den Glykogengehalt

1. Vergleich mit den Ergeonissen anderer Autoren

Sowohl nach 3 Wochen als auch nach 6 Wochen Clofibrat war ein Konzentrationsabfall von Glykogen in der Skelett- und Herzmuskulatur zu beobachten. Dieser Effekt wurde auch von anderen Autoren dokumentiert, in der Rattenleber (⁷⁰Platt, 1966; ⁹⁹Wilkening und Schwandt, 1977; ¹⁰³Zakim, 1970), in der Hundeleber (³³Gans, 1971) und in der Skelettmuskulatur von Ratten (⁵²Miyazawa, 1975; ⁶⁶Paul, 1977); ein durch Clofibrat induzierter Glykogenabfall in der Herz-

muskulatur wurde jedoch bis jetzt nicht beschrieben. In der von 1967-77 gesichteten Literatur existiert keine Arbeit, in der kein oder der umgekehrte Effekt von Clofibrat auf das Glykogen beschrieben wurde.

2. Deutung des Glykogenabfalls

Auf welche Weise Clofibrat die Glykogenkonzentration beeinflusst, ist nicht ganz klar. Ein Konzentrationsabfall von Glykogen ist möglich durch einen verstärkten Glykogenabbau u./o. durch eine verminderte Glykogensynthese.

a. Diskussion einer verstärkten Glykogenolyse als Ursache für den Glykogenabfall durch Clofibrat

Nach 6 Wochen Clofibrat beobachteten wir eine Abnahme von ATP und Kreatin-Phosphat (das bedeutet einen Anstieg von P_i) und einen Anstieg von AMP; nach 3 und 6 Wochen Clofibrat einen Abfall von Glukose-6-Phosphat. Diese Ergebnisse bieten eine Erklärung für eine verstärkte Glykogenolyse. Denn der Glykogenabbau ist nicht nur möglich über eine Umwandlung von Phosphorylase b in Phosphorylase a, sondern auch durch eine Aktivierung der Phosphorylase b; aktiviert wird die Phosphorylase b durch AMP und P_i , diese Aktivierung wird durch Glukose-6-Phosphat und ATP gehemmt (⁵⁴Morgan und Parmeggiani, 1964).

Bei der Herzmuskulatur sprechen neben den von uns gemessenen Parametern ATP, AMP, Kreatin-Phosphat und Glukose-6-Phosphat noch andere, in der Literatur beschriebene Parameter für die Annahme einer verstärkten Glykogenolyse, nämlich 1. die Wirkung von Clofibrat auf Glukagon und 2. die Wirkung von Clofibrat auf die FFA.

ad 1: ²⁶Eaton (1973) zeigte, daß durch Clofibrat die Arginin stimulierte Glukagonsekretion verstärkt wird; Glukagon aber bewirkt im perfundierten Rattenherz eine Umwandlung von Phosphorylase b in Phosphorylase a.

ad 2: Clofibrat senkt den Plasmaspiegel der FFA (⁷Barett, 1968; ¹⁸Cenedella, 1968; ⁹²Vester, 1970; ²⁹Fenderson, 1974),

Clofibrat senkt die Carnitin stimulierte Palmitat-Utilisation in isolierten Herzmitochondrien (⁸³Stein, 1976); eine erhöhte Aufnahme und ein verstärkter Abbau der FFA in der Herzmuskulatur aber hemmt den Glykogenabbau (⁷²Rizza, 1971); somit ist also der "glykogensparende" Effekt der FFA durch Clofibrat reduziert, d.h. es könnte eine gesteigerte Glykogenolyse resultieren.

⁷⁰Platt (1966), welcher den durch Clofibrat induzierten Glykogenverlust in der Leber aufzeigte, vermutete, daß der verminderte Glykogengehalt durch einen erhöhten Thyroxinspiegel in der Leber bedingt ist (Thyroxin beschleunigt den Glykogenabbau). Dies begründete Platt damit, daß Thyroxin, welches wie Clofibrat an Albumin gebunden ist (⁸⁷Thorpe, 1964), durch Clofibrat aus seiner Albuminbindung verdrängt und in der Leber angereichert wird (⁶¹Osorio, 1965), und daß weiterhin die durch Clofibrat induzierte Glykogenverarmung derjenigen durch Thyroxin induzierten Glykogenverarmung histologisch ähnelt. Die durch Thyroxin induzierte Glykogenverarmung ist aber spezifisch für die Leber, ein derartiger Abbaumechanismus kommt nicht in Frage für das Herz oder die Skelettmuskulatur; denn weder Herz noch Skelettmuskulatur akkumulieren von Clofibrat aus der Albuminbindung verdrängtes Thyroxin, sondern spezifisch die Leber (⁶¹Osorio, 1965; ⁶⁴Ruegamer, 1969).

b. Diskussion einer verminderten Glykogensynthese als Ursache für den Glykogenabfall durch Clofibrat

Als Ursache des verminderten Glykogengehalts vermuteten ¹⁰³Zakim (1970) und ³³Gans (1971) eine verminderte Glykogensynthese. In der Tat beobachteten beide eine verminderte (¹⁴C)-Glukose Inkorporation in das Glykogen von Leberstückchen. Bei ³³Gans (1971) erreichte der Abfall der (¹⁴C)-Glukose Inkorporation in vitro das gleiche Ausmaß wie der Konzentrationsabfall des Glykogens im Lebergewebe in vivo.

Eine verminderte Glykogensynthese kann durch folgende Be-

obachtungen erklärt werden:

1. Immunoreaktives Insulin ist während der Behandlung mit Clofibrat bei Ratten reduziert (⁹⁶Weis, 1973);
2. es ist schon lange bekannt, daß Insulin im Muskel eine verstärkte Glykogenablagerung sowohl in vitro (³⁶Gemmil, 1940) als auch in vivo (⁴⁸Levin, 1958) bewirkt;
3. dieser Effekt ist dadurch bedingt, daß die Glykogensynthetase (α 1,4-glucan- α 4-glycosyltransferase, EC 2.4.1.11) zum größeren Teil als Glykogensynthetase I vorliegt (²⁰Craig, 1969; ⁹³Villar-Palasi, 1967), d.h. Insulin bewirkt eine Konversion der Synthetase D, welche unter physiologischen Bedingungen inaktiv ist (⁵⁷Newsholme, 1974), in die aktive Synthetase I.

Eine solche Rolle des Insulins in der Regulation der Glykogensynthese gilt auch für das Herz: Im perfundierten Herz bewirkt Insulin einen Anstieg des Glykogengehalts, verbunden mit einer D $\rightarrow$ I Konversion der Synthetase (³Adolffson, 1971).

3. Auswirkung einer i.p. Glukosebelastung auf den durch Clofibrat in-duzierten Glykogenabfall

Ein signifikanter Konzentrationsunterschied von Glykogen im Herz- und Skelettmuskel zwischen Clofibrat- und Kontrollgruppe war nach einer intraperitonealen (i.p.) Glukosebelastung nicht mehr vorhanden. Auch war der prozentuale Unterschied von Glykogen zwischen Clofibrat- und Kontrollgruppe kleiner nach der i.p. Glukosebelastung als vor der i.p. Glukosebelastung. Diese Nivellierung in der Glykogenkonzentration zwischen Clofibrat- und Kontrollgruppe wurde dadurch bedingt, daß nach der i.p. Belastung in der Clofibratgruppe ein Konzentrationsanstieg von Glykogen zustandekam, während in der kontrollgruppe kein (Skelettmuskel) oder ein nur geringer (Herzmuskel) Konzentrationsanstieg von Glykogen durch die i.p. Glukosebelastung bewirkt wurde. Ein Anstieg in der Glykogenkonzentration ist durch einen prozentualen Anstieg der Synthetase in der

I-Form bedingt. Ein prozentualer Anstieg der Synthetase in der I-Form aber ist nach einer oralen Glukosebelastung sowohl beim Menschen, als auch bei der Ratte nachweisbar (⁵⁹Nuttal, 1972; ⁶⁰Nuttal, 1977). Warum dennoch in der Kontrollgruppe keine oder nur eine geringe Neusynthese von Glykogen nach einer i.p. Glukosebelastung stattgefunden hat, läßt sich durch die Ergebnisse von ²²Danforth (1965) und ⁴¹Huijing (1969) erklären: sowohl im Skelettmuskel (²²Danforth, 1965), als auch im Herzmuskel (⁴¹Huijing, 1969) besteht zwischen der Glykogenkonzentration und der relativen Aktivität der Synthetase in der I-Form eine umgekehrte Relation; d.h., solange die Glykogenkonzentration hoch ist, ist die relative Aktivität der Synthetase in der I-Form niedrig und umgekehrt; die Beobachtung, daß die Synthetase-D-Phosphatase vom Skelettmuskel (⁹⁴Villar-Palasi, 1970), wie auch vom Herzmuskel (⁴¹Huijing, 1969) durch physiologische Glykogenkonzentrationen gehemmt wird, mag diese umgekehrte Relation erklären. In unserem Fall bedeutet das, daß die relativ hohe Glykogenkonzentration in der Kontrollgruppe dem Anstieg der Synthetase in der I-Form, bedingt durch die Glukosebelastung, entgegenwirkte, d.h., es resultierte in der Kontrollgruppe keine (Skelettmuskel) oder eine nur sehr geringe Neusynthese (Herzmuskel) von Glykogen. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse von ⁵³Moorthy (1969) bekräftigt. Moorthy beobachtete, daß im isolierten Musculus soleus der Ratte eine Neusynthese stattfand, wenn dem Inkubationsmedium Glukose zugeführt wurde; andererseits war diese Neusynthese nur dann nachzuweisen, wenn die Glykogenspeicher des Muskels vorher teilweise entleert wurden. Der wahrscheinliche Mechanismus, der zur Nivellierung der Glykogenkonzentration zwischen Clofibrat und Kontrollgruppe führte, läßt sich also folgendermaßen zusammenfassen:

Kontrollgruppe, voller Glykogenspeicher, dadurch Hemmung der durch die i.p. Glukosebelastung bedingten Konversion der Synthetase D in die Synthetase I, dadurch keine oder

nur geringe Neusynthese von Glykogen; Clofibratgruppe, teilweise entleerter Glykogenspeicher, dadurch keine Hemmung der durch die i.p. Glukosebelastung bedingten Konversion der Synthetase D in die Synthetase I, dadurch Neusynthese von Glykogen.

III. Clofibrat und dessen Wirkung auf den ATP-Gehalt

1. Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren

Nach 3 Wochen Clofibrat war keine signifikante Konzentrationsänderung von ATP sowohl in der Skelett- als auch in der Herzmuskulatur zu beobachten; zu einem ähnlichen Ergebniss kam ⁵²Miyazawa (1975) in der Rattenleber nach 2 Wochen Clofibrat. Erst nach 6 Wochen Clofibrat zeigte ATP einen Konzentrationsabfall, der in der Skelettmuskulatur signifikant war; ähnlich, aber nicht signifikant war dieser Abfall in der Herzmuskulatur. In der Rattenleber fanden ⁹⁹Wilkening und Schwandt (1977) bereits nach 3 Wochen Clofibrat einen signifikanten Konzentrationsabfall von ATP. Weitere Ergebnisse über den Einfluß von Clofibrat auf den ATP-Gehalt liegen in der Literatur nicht vor.

2. Deutung des durch Clofibrat bedingten Konzentrationsabfalls von ATP

Möglicherweise führte der beobachtete Konzentrationsabfall der Glukose-Metabolite zu einem ungenügenden Substrat-Angebot für die anaerobische ATP-Regeneration während der Muskelkontraktion; jedoch war der Abfall von Glykogen und anderen Metaboliten der Glukose schon 3 Wochen vor dem Abfall des ATP zu beobachten.

In der Literatur sind einige Daten zu finden, die vermuten lassen, daß Clofibrat mit der mitochondrialen Atmung und Phosphorylation interferiert. In vitro konnte gezeigt werden, daß Clofibrat in Lebermitochondrien den Sauerstoffverbrauch im Status III und das P/O verhältnis senkt (¹⁶Cederbaum, 1974; ⁵⁰Mackerer, 1974); den gleichen Effekt,

wenn auch erst ab höheren Konzentrationen, zeigte Chlorophenoxyisobutyrat (⁶²Panini, 1974; ⁵⁰Mackerer, 1974); Chlorophenoxyisobutyrat, der hydrolysierte Ester von Clofibrat, ist diejenige Form, die in vivo vorliegt (⁸⁶Thorp, 1962). In vivo andererseits konnten diese Effekte gar nicht oder nur teilweise nachgewiesen werden. Isolierte Lebermitochondrien von Ratten, denen täglich 300 mg Clofibrat/kg Körpergewicht 1 Woche lang verfüttert wurden, zeigten weder eine Veränderung der mitochondriellen Atmung im Status III, noch eine Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung (⁵⁰Mackerer, 1974). Wenn dagegen Ratten täglich 300 mg Clofibrat/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von 14 bzw. 18 Tagen subcutan injiziert wurden, so war in den von diesen Ratten isolierten Lebermitochondrien die oxydative Phosphorylierung nicht beeinflusst, wie das ADP/O Verhältnis zeigte; andererseits aber war die Atmungskette im Status III gehemmt: es war ein Abfall des Sauerstoffverbrauchs zu beobachten, wenn der Atmungskette als Elektronendonatoren Glutamat, Succinat oder Ascorbat angeboten wurden (¹⁷Cederbaum, 1976). Weiterhin beobachtete ¹⁷Cederbaum (1976) in den isolierten Lebermitochondrien einen abgeschwächten Fettsäureabbau aus Palmitoyl-l-Carnitin, wie aus dem Abfall des Sauerstoffverbrauchs, der CO₂-Produktion und der Ketonkörperproduktion zu ersehen war. Cederbaum vermutete, daß diese in vivo zu beobachtenden Veränderungen der mitochondriellen Atmung chronische Veränderungen der Mitochondrien widerspiegeln, da das Inkubationsmedium der Mitochondrien kein Clofibrat enthielt und außerdem die Mitochondrien vor der Inkubation gewaschen wurden. Ähnliche, jedoch nicht signifikante Ergebnisse zeigte der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien der Skelettmuskulatur, wenn Glutamat bzw. Succinat bzw. Ascorbat bzw. Palmitoyl-l-Carnitin als Substrat angeboten wurden; Cederbaum (¹⁷Cederbaum, 1976) schloß daraus, daß Muskelmitochondrien mehr resistent gegenüber den Effekten von Clofibrat sind. Mehr Daten über den Einfluß von Clofibrat auf die oxydative

Phosphorylierung und Respiration liegen nicht vor. Nach 3 Wochen Clofibrat war auch bei uns keine signifikante Konzentrationsänderung von ATP vorhanden; erst nach 6 Wochen Clofibrat fiel die Konzentration von ATP im Skelettmuskel signifikant ab. Eine Erklärung könnten Daten über die mitochondrielle Respiration und Phosphorylation von Experimenten, in denen Clofibrat über einen Zeitraum von wenigstens 6 Wochen verfüttert wurde, geben.

F. Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wurde der Einfluß von Clofibrat auf Glykogen, Glykolyse und Adeninnucleotide in der Muskulatur von Ratten untersucht.

Nach 3 Wochen Clofibrat fand sich eine nicht signifikant verringerte Aktivität der Hexokinase (HK) und Phosphofructokinase (PFK). Die Aktivität der Pyruvatkinase (PK) war unverändert.

Die quantitativ bedeutensten Metabolite der Glykolyse fielen nach 3 wöchiger Exposition mit Clofibrat signifikant ab.

Ebenso fand sich eine Reduktion der Konzentration von Glykogen sowohl in der Skelett- als auch der Herzmuskulatur. Eine intraperitoneale Glukosebelastung konnte die unter Clofibrat teilweise entleerten Glykogenspeicher wieder auffüllen.

Ein signifikanter ATP-Abfall fand sich nach 6 wöchiger Exposition mit Clofibrat nur im Skelettmuskel.

G. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Adam, H.
Methoden der enzymatischen Analyse (ed. H.U. Bergmeyer)
Verlag Chemie Weinheim, 573, 1962
2. Adams, L.L., W.W. Webb, H.J. Fallon
Inhibition of hepatic triglyceride formation by clofibrate
J. Clin. Invest., 50, 2339, 1971
3. Adolffson, S., O. Isaksson, A. Hjalmarson, K. Ahren
Insulin and regulation of heart glykogen
Acta endocrin., Suppl. 155, 190, 1971
4. Mc Ardle, B.
Myopathie due to defect in muscle glykogen breakdown
Clin. Sci., 10, 13, 1951
5. Atkinson, D.E.
The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers
Biochem., 7, 4030, 1968
6. Avoy, D.R., E.A. Swyryd, R.G. Gould
Effects of CPIB with and without androsterone on cholesterol biosynthesis in rat liver
J. Lipid. Res., 6, 369, 1965
7. Barett, A.M., J.M. Thorp
Studies on the mode of action of clofibrate: effects on hormone induced changes in plasma FFA, cholesterol, phospholipid and total esterified fatty acids in rats and dogs
Br. J. Pharmac., 32, 381, 1968

8. Bergmeyer, H.U., E. Bernt, L. Graßl, G. Michal
Methoden der enzymatischen Analyse (ed. H.U.Bergmeyer)
Verlag Chemie Weinheim, 273, 1970
9. Best, M.M., C.H. Duncan
Hypolipemia and hepatomegaly from CPFB in rat
J. Lab. Clin. Med., 64, 634, 1964
10. Bowman, R.H.
Inhibition of citrate metabolism by sodium fluoroacetat
in the perfused rat heart and the effect on phosphofruc-
tokinase activity and glucose utilization
Biochem. J., 93, 130, 1964
11. Bridgman, J.F., S.M. Rosen, J.M. Thorp
Complications during clofibrate treatment of nephrotic
syndrome hyperlipoproteinemia
Lancet, Sept., 506, 1972
12. Brock, D.J.H.
Purification and properties of sheep liver phosphofruc-
tokinase
Biochem. J., 113, 235, 1969
13. Bruns, W., R. Michael
Effect of clofibrate therapy in hyperlipidaemic patients
with disturbed carbohydrate tolerance
Diabetologia, 6, 622, 1970
14. Bücher, Th., H.J. Hohorst
Methoden der enzymatischen Analyse (ed. H.U. Bergmeyer)
Verlag Chemie Weinheim, 1491, 1974
15. Bücher, Th., W. Rüssmann
Angewandte Chemie
Internat. Edit., 3, 421, 1964

16. Cederbaum, A.J., Th. Madharan, E. Rubin
Effects of clofibrate on mitochondrial function
Biochem. Pharmacol., 23, 1985, 1974
17. Cederbaum, A.J., Th. Madharan, E. Rubin
Effect of chronic clofibrate administration on mitochondrial fatty acid oxidation
Biochem. Pharmacol., 25, 1285, 1976
18. Cenedella, R.J., J.J. Jarrell, L.H. Saxe
Effects of clofibrate on the plasma and red blood cell free fatty acids of the rat
J. Atheroscl. Res., 8, 903, 1968
19. Crabtree, B., E.A. Newsholme
Activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase in muscles from vertebrates and invertebrates
Biochem. J., 126, 49, 1972
20. Craig, J.W., Th.W. Rall, J. Larner
The influence of insulin and epinephrin on adenosin-3',5'-phosphate and glycogen transferase in muscle
Biochim. Biophys. Acta, 177, 213, 1969
21. Czok, R., W. Lamprecht
Methoden der enzymatischen Analyse (ed. H.U. Bergmeyer)
Verlag Chemie Weinheim, 1491, 1974
22. Danforth, W.H.
Glycogen synthetase activity in skeletal muscle
J. Biol. Chem., 240, 588, 1965
23. Davis, B.D.
The teleonomic significance of biosynthetic control mechanisms
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26, 1, 1961

24. Denizot, M., J. Fabre, D. Pometta, E. Wildi
Clofibrate, nephrotic syndrome and histological changes
in muscle
Lancet, 1, 1326, 1973
25. Dromgoole, S., D. Campion, J. Peter
Myotonia induced by clofibrate and sodium chlorophenoxy-
isobutyrate
Biochem. Med., 14 (2), 238, 1975
26. Eaton, R.P.
Effect of clofibrate on arginin-induced insulin and glu-
cagon secretion
Metabolism, 22, 763, 1973
27. Eaton, R.P., W.H.R. Nye
The relationship between insulin and triglyceride con-
centration in endogenous lipemia
J. Lab. Clin. Med., 81, 682, 1973
28. Eberstein, A., J. Goodgold
Myotonia induced with clofibrate
EEG-Journal, 36 (1), 101, 1974
29. Fenderson, R.W., J. Sekowski, Ch. Mchan, St. Deutsch
Effect of clofibrate on plasma glucose and serum immu-
noreactive insulin in patients with hyperlipoprotein-
emia
Am.J. Clin. Nutr., 27, 22, 1974
30. Ferrari, C., S. Frezzati, G. Testori, A. Bertazoni
Potentiation of hypoglycemic response to intravenous
tolbutamide by clofibrate
N. Eng. J. Med., 294 (21), 1184, 1976

31. Gabriel, R., J.M.S. Pearce
Clofibrate induced myopathy and neuropathy
Lancet, December, 1279, 1975

32. Ganong, W.F.
Physiologie
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1972

33. Gans, J.H., M.R. Cater
Metabolic effects of clofibrate and of cholestyramine
administration to dogs
Biochem. Pharmacol., 20, 3321, 1971

34. Garland, P.B., P.J. Randle, E.A. Newsholme
Citrate as an intermediary in the inhibition of phospho-
fructokinase in rat heart muscle by fatty acids, ketone
bodies, pyruvate, diabetes and starvation
Nature, 200, 169, 1963

35. Geltner, D., M. Chaco, M. Shapiro
Reversible myopathy induced by clofibrate
Postgrad. Med. J., 51, 184, 1975

36. Gemmell, C.L.
Effect of insulin on glycogen content of isolated muscles
Bull. Johns Hopkins Hosp., 66, 232, 1940

37. Giaccoli, G., H.M. Tepperman, J. Tepperman
Effects of CPIB on adipose tissue triglycerides synthe-
sis, lipogenesis and some related enzymes
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 134, 1035, 1970

38. Green, H.L., R.H. Herman, D. Zakim
The effect of clofibrate on rat adenyl-cyclase
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 134, 1055, 1970

39. Hohorst, H.J.
Methoden der enzymatischen Analyse (ed. H.U. Bergmeyer)
Verlag Chemie Weinheim, 1425, 1968
40. Hohorst, H.J.
Methoden der enzymatischen Analyse (ed. H.U. Bergmeyer)
Verlag Chemie Weinheim, 1200, 1968
41. Huijing, F., F.Q. Muttall, C. Villar-Palasi, J. Larner
UDP-glucose: α -1,4-glucan- α -glycosyltransferase in heart.
Regulation of the activity of the transferase in vivo and
in vitro in rat. A dissociation in the action of insulin
on transport and on transferase conversion
Biochim. Biophys. Acta, 177, 204, 1969
42. Katsilambros, N., J. Braaten
Muscular syndrome after clofibrate
N. Engl. J. Med., 286 (20), 1110, 1972
43. Keppler, D., K. Decker
Methoden der enzymatischen Analyse (ed. H.U. Bergmeyer)
Verlag Chemie Weinheim, 1171, 1974
44. Lamb, R.G., H.J. Fallon
Inhibition of monoacylglycerophosphate formation by chlorophenoxyisobutyrate and β -benzalbutyrate
J. Biol. Chem., 247, 1281, 1972
45. Lamprecht, W., J. Trautschold
Methoden der enzymatischen Analyse (ed. H.U. Bergmeyer)
Verlag Chemie Weinheim, 2151, 1974
46. Langer, T., R. Levy
Acute muscular syndrome associated with administration
of clofibrate
N. Engl. J. Med., 279 (16), 856, 1968

47. Lardy, H.A., R.E. Parks
Enzymes-units of biological structure and function
Ed. O.H. Gaebler, New-York, Academic, 584, 1956

48. Levin, H.W., S. Weinhouse
Immediate effects of insulin on glucose utilization in
normal rats
J. Biol. Chem., 232, 749, 1958

49. Lufkin, E., F. Stifel, H. Green, R.H. Herman
Suppression of activities of carbohydrate-metabolizing
enzymes in adipose tissue of obese humans by clofibrate
J. Lab. Clin. Med., 84 (5), 698, 1974

50. Mackerer, C.R., J.R. Haettinger
Further studies concerning the effects of clofibrate on
respiration and oxidative phosphorylation of rat liver
mitochondria
Biochem. Pharmac., 23, 3331, 1974

51. Mansour, T.E.
Studies on heart phosphofructokinase in purification,
inhibition and activation
J. Biol. Chem., 238, 2285, 1963

52. Miyazawa, S., T. Sakurai
Effects of ethyl-p-chlorophenoxyisobutyrate on carbohy-
drate and fatty acid metabolism in rat liver
J. Biochem., 78, 1171, 1975

53. Moorthy, K.A., M.K. Gould
Synthesis of glycogen from glucose and lactate in iso-
lated rat soleus muscle
Arch. Biochem. Biophys., 130, 399, 1969

54. Morgan, H.E., A. Parmeggiani
Regulation of glycogenolysis in muscle
III. Control of muscle glycogen phosphorylase activity
J. Biol.Chem., 239, 2440, 1964
55. Morgan, H.E., A. Parmeggiani
Regulation of glycogenolysis in muscle
II. Control of glycogen phosphorylase reaction in isolated perfused heart
J. Biol. Chem., 239, 2435, 1964
56. Nestel, P.J., W. Austin
The effect of CPIB on the uptake of triglyceride fatty acids, activity of lipoprotein lipase and lipogenesis from glucose in fat tissue of rats
J. Atheroscl. Res., 8, 827, 1968
57. Newsholme, E.A., C. Start
Regulation in metabolism
Verlag John Wiley & Sons
London-New-York-Sydney-Toronto, 1974
58. Newsholme, E.A., P.J. Randle
Regulation of glucose uptake by muscle. 7. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan-diabetes, starvation, hypophysectomie and adrenalectomy on the concentrations of hexose phosphates, nucleotides and inorganic phosphate in perfused rat heart
Biochem. J., 93, 641, 1964
59. Nuttall, F.Q., M.C. Gannon, J. Larner
Effect of oral glucose on glycogen synthetase and phosphorylase activity in muscle and liver
Physiol. Chem. Phys., 4, 497, 1972

60. Nuttal, F.Q., J. Barbosa, M.C. Gannon
Activation of skeletal muscle glycogen synthetase following glucose administration in normal males
Metabolism, 26, 719, 1977

61. Osorio, C., K.W. Walton, C.H.W. Browne, D. West, P. Whystock
The effect of Atromid-S on the biliary excretion and distribution of thyroxine in the rat
Biochem. Pharmacol., 14, 1479, 1965

62. Panini, S.R., C.K. Kurup
Mode of inhibition of mitochondrial energy transduction by chlorophenoxyisobutyrate
Biochem. J., 142, 253, 1974

63. Parmeggiani, A., R.H. Bowman
Regulation of phosphofructokinase activity by citrate in normal and diabetic rats
Biochem. Biophys. Res. Commun., 12, 268, 1963

64. Passoneau, J. V., O.H. Lowry
Phosphofructokinase and the Pasteur effect
Biochem. Biophys. Res. Commun., 7, 10, 1962

65. Passoneau, J.V., O.H. Lowry
Fructokinase and the control of the citric acid cycle
Biochem. Biophys. Res. Commun., 13, 372, 1963

66. Paul, H.S., S.A. Adibi
Effect of clofibrate on composition and substrate utilization of skeletal muscle
Clin. Res., 25 (3), A 396, 1977

67. Perreira, J.N., G.F. Holland
Atherosclerosis Proc., Sec. Int. Symp.
New-York, Springer Verlag, 549, 1970

68. Pierides, A.M., F. Alvarez-Ude, D.N.S. Kerr
Clofibrate-induced muscle damage in patients with chronic renal failure
Lancet, December, 1279, 1975
69. Platt, D.S., B.L. Cockrill
Changes in the liver concentrations of the nicotinamide adenine dinucleotide coenzymes and in the activities of oxidoreductase following treatment of the rat with Atromid-S
Biochem. Pharmacol., 15, 927, 1966
70. Platt, D.S., J.M. Thorp
Changes in the weight and composition of the liver in the rat, dog and monkey treated with CPIB
Biochem. Pharmacol., 15, 915, 1966
71. Randle, P.J., G.H. Smith
Regulation of glucose uptake by muscle
Biochem. J., 70, 490, 1958
72. Rizza, R.A., M.F. Crass, J.C. Shipp
Effect of insulin treatment in vivo on heart glycerides and glycogen of alloxan diabetic rats
Metabolism, 20, 539, 1971
73. Rolleston, F.S.
Current topics in cellular regulation
Ed. B.L. Horecker & E.W. Stadtman
London & New York: Academic Press, Vol 5, 47, 1972
74. Ruegamer, W.R., N.T. Ryan, D.A. Richert, W.W. Westerfeld
The effects of CPIB on the turnover rate and distribution of thyroid hormone in the rat
Biochem. Pharmacol., 18, 613, 1969

75. Rumpf, K.W., R. Aboers, F. Scheler
Clofibrate induced myopathy syndrome
Lancet, 1 (7953), 249, 1976
76. Sachs, L.
Angewandte Statistik
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1974
77. Schwandt, F., P. Weisweiler, G. Neureuther, J. Wilkening
Einfluß von Clofibrat auf Glukosetoleranz und Insulinsekretion bei Patienten mit endogener Hypertriglyzeridämie
Münch. med. Wschr., 118, 351, 1976
78. Segal, P., P.S. Roheim, H.A. Eder
Mechanism of action of CPIB in hyperlipemic rats
Circulation, 39, 182, 1969
79. Sekowski, J., P. Samuel
Clofibrate induced acute muscular syndrome
Am. J. Card., 30, 572, 1972
80. Siegenthaler, W.
Klinische Pathophysiologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1973
81. Slein, M.
Methoden der enzymatischen Analyse (ed. H.U. Bergmeyer)
Verlag Chemie Weinheim, 117, 1962
82. Smith, A.F., W.G. Macfie, M.F. Oliver
Clofibrate, serum enzymes and muscle pain
Brit. Med. J., 2, 86, 1970
83. Stein, H.H., J. Cohen
The inhibition by clofibrate of carnitin-stimulated palmitate utilization by isolated heart mitochondria
Fed. Proc., 35, 746, 1976

84. Tanaka, T., Y. Harano, F. Sue, H. Morimura
Crystallization, characterization and metabolic regulation of two types of pyruvatekinase isolated from rat tissue
J. Biochem., 62, 71, 1967
85. Taunton, O.D., F.B. Stifel, H.L. Green, R.H. Herman
Rapid reciprocal changes of rat hepatic glycolytic enzymes and fructose-1-6-diphosphatase following glucagon and insulin injection in vivo
Biochem. Biophys. Res. Commun., 48, 1663, 1972
86. Thorp, J.M., W.S. Waring
Modification of metabolism and distribution of lipids by ethylchlorophenoxyisobutyrate
Nature, 194, 948, 1962
87. Thorp, J.M.
Adsorption and distribution of drugs
Ed. T.B. Binns, Livingstone, Edinburgh, 1964
88. Thorp, J.M.
Experimental evaluation of an orally active combination of androsterone with ethylchlorophenoxyisobutyrate
Lancet, 1, 1323, 1962
89. Tolman, E.L., H.M. Tepperman, J. Tepperman
Effect of CPIB on rat adipose tissue lipoprotein lipase activity
Am.J. Phys., 218, 1313, 1970
90. Underwood, A.H., E.A. Newsholme
Properties of phosphofructokinase from rat liver and their relation to the control of glycolysis and gluconeogenesis
Biochem.J., 95, 868, 1965

91. Vester, J.W., G. Sabeh, T.S. Danowski
No muscle damage from clofibrate
N. Eng. J. Med., 280 (2), 110, 1969
92. Vester, J.W., J.H. Sunder, J.H. Aarons, T.S. Danowski
Long term monitoring during clofibrate therapy
Clin. Pharmacol. Therap., 11, 689, 1970
93. Villar-Palasi, C., J.J. Wenger
In vivo effect of insulin on muscle glycogen-synthetase.
Identification of the action pathway
Fed. Proc., 26, 563, 1967
94. Villar-Palasi, C., J. Larner
Glycogen metabolism and glycolytic enzymes
Annu. Rev. Biochem., 39, 639, 1970
95. Weber, G., R.L. Singhal, N.B. Stamm, M.A. Lea, E.A. Fin-
sner
Synchronous behavior of key glycolytic enzymes:
glucokinase, phosphofructokinase and pyruvatekinase
Adv. Enzym. Reg., 4, 59, 1966
96. Weis, A., H.M. Tepperman, J. Tepperman
Effects of CPIB on serum insulin levels, insulin sensi-
tivity and adipose tissue cyclic AMP concentration
Endocrin., 93, 504, 1973
97. Westerfeld, W.W., J.C. Elwood, D.A. Richert
Effect of clofibrate on handling of dietary and liver
fat
Biochem. Pharmacol., 21, 1117, 1972
98. White, L.W.
Regulation of hepatic cholesterol biosynthesis by clo-
fibrate administration
J. Pharmacol. Exp. Ther., 178, 361, 1971

99. Wilkening, J., F. Schwandt
Alterations of the glycolytic pathway and adeninnucleotide state in livers of clofibrate treated rats
Horm. Metab. Res., 9, 101, 1977
100. Williamson, J.R.
Glycolytic control mechanisms. Inhibition of glycolysis by acetate and pyruvate in the isolated, perfused rat heart
J. Biol. Chem., 240, 2308, 1965
101. Wilson, D.E., R.S. Lees
Metabolic relationships among plasma lipoproteins - reciprocal changes in concentrations of very low and low density lipoproteins in man
J.Clin. Invest., 51, 1051, 1972
102. Wollenberger, A., O. Ristau, G. Schoffa
Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebstücke
Pflügers Archiv ges. Phys., 270, 399, 1960
103. Zakim, D., R.S. Paradini, R.H. Herman
Effect of clofibrate feeding on glycolytic and lipogenic enzymes and hepatic glycogen synthesis in the rat
Biochem. Pharmacol., 19, 305, 1970
104. Zakim, D., R.H. Herman, M.D. Rosensweig
Clofibrate induced changes in the activity of human intestinal enzymes
Gastroent., 56 (3), 496, 1969

Lebenslauf

6. Juli 1952	geboren in Garmisch als Sohn (3. Kind) des Richters Max Wolpert und seiner Frau, Gisela Wolpert, Geigenlehrerin
1958 - 1962	Besuch der Volksschule in Garmisch-Parten- kirchen
1962	Übertritt in den humanistischen Zweig des Werdenfels-Gymnasium in Garmisch-Pa.
Juni 1971	Abitur am Werdenfels-Gymnasium in Garmisch- Partenkirchen
Winter-Seme- ster 71/72	Immatrikulation an der LMU München als or- dentlicher Student der Medizin
Oktober 72	Naturwissenschaftliche Vorprüfung an der LMU München
April 74	Ärztliche Vorprüfung (Physikum) an der LMU München
April 75	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der LMU München
April 77	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der LMU München
April 77 bis	Praktische Ausbildung ("Praktisches Jahr") in den Fächern Gynäkologie (II. Universi- täts-Frauenklinik, München), Innere Medizin
März 78	(Krankenhaus München-Schwabing) und Chirur- gie (II. Chirurgische Klinik, Augsburg)
April 78	Schriftlicher Teil des 3. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung an der LMU München
Mai 78	Mündlicher Teil des 3. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung an der LMU München
Juni 78	Approbation

